

REC'D 26 JUL 2004

WIPO

PCT



별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto
is a true copy from the records of the Korean Intellectual
Property Office.

출 원 번 호 : 10-2003-0043599
Application Number


출 원 년 월 일 : 2003년 06월 30일
Date of Application JUN 30, 2003

출 원 인 : 최무현
Applicant(s) CHOE Mu Hyeon

2004 년 07 월 06 일

특 허 청

COMMISSIONER



PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

【서지사항】

【서류명】	특허출원서
【권리구분】	특허
【수신처】	특허청장
【제출일자】	2003.06.30
【발명의 명칭】	이황화결합 가교로 형성된 키메라 재조합 접착도메인-작용기 융합체의 이랑체 및 이의 제조 방법
【발명의 영문명칭】	A Dimer of Chimeric Recombinant Binding Domain-Functional Group Fusion formed via Disulfide-bond-bridge and A Process For Producing The Same
【출원인】	
【성명】	최무현
【출원인코드】	4-2002-023774-1
【대리인】	
【성명】	이덕록
【대리인코드】	9-1998-000461-7
【포괄위임등록번호】	2003-045016-3
【발명자】	
【성명】	최무현
【출원인코드】	4-2002-023774-1
【발명자】	
【성명의 국문표기】	최성혁
【성명의 영문표기】	CHOI, Seong Hyeok
【주민등록번호】	730213-1453410
【우편번호】	314-882
【주소】	충청남도 공주시 신풍면 산정리 3구 769
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	이용찬
【성명의 영문표기】	LEE, Yong Chan
【주민등록번호】	730928-1475726
【우편번호】	356-805
【주소】	충청남도 서산시 읍내동 138번지
【국적】	KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 권혜원
 【성명의 영문표기】 KWON, Hye Won
 【주민등록번호】 750319-2030911
 【우편번호】 156-030
 【주소】 서울특별시 동작구 상도5동 삼호아파트 101-1101
 【국적】 KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 원재선
 【성명의 영문표기】 WON, Jae Seon
 【주민등록번호】 751008-2036211
 【우편번호】 120-193
 【주소】 서울특별시 서대문구 북아현3동 1-164
 【국적】 KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 유미현
 【성명의 영문표기】 YU, Mi Hyun
 【주민등록번호】 770928-2056417
 【우편번호】 158-077
 【주소】 서울특별시 양천구 신정7동 목동2차 삼성레미안 101동 1001호
 【국적】 KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 송정화
 【성명의 영문표기】 SONG, Jeong Hwa
 【주민등록번호】 770817-2496616
 【우편번호】 137-061
 【주소】 서울특별시 서초구 방배1동 171-3 대운빌라 A-205
 【국적】 KR

【발명자】

【성명의 국문표기】 김용재
 【성명의 영문표기】 KIM, Yong Jae
 【주민등록번호】 760603-1000216

【우편번호】	139-923
【주소】	서울특별시 노원구 중계동 양지대림아파트 104동 1504호
【국적】	KR
【우선권주장】	
【출원국명】	KR
【출원종류】	특허
【출원번호】	10-2002-0037770
【출원일자】	2002.06.29
【증명서류】	미첨부
【공지예외적용대상증명서류의 내용】	
【공개형태】	간행물 발표
【공개일자】	2001.12.31
【핵산염기 및 아미노산 서열목록】	
【서열개수】	12
【서열목록의 전자파일】	첨부
【취지】	특허법 제42조의 규정에 의하여 위와 같이 출원합니다. 대리인 이덕록 (인)
【수수료】	
【기본출원료】	20 면 29,000 원
【가산출원료】	115 면 115,000 원
【우선권주장료】	1 건 26,000 원
【심사청구료】	0 항 0 원
【합계】	242,000 원
【감면사유】	개인 (70%감면)
【감면후 수수료】	69,200 원
【첨부서류】	1. 요약서·명세서(도면)_1통 2. 공지예외적용대상(신규성상실의 예외, 출원시의특례)규정을 적용받 기 위한 증명서류_1통(이하에 명기한 제출서류에 첨부된 것을 원용) [서류명]공제예외적용주장 대상증명서류제출서 [출원번호] 10-2002-0037770

【요약서】

【요약】

본 발명은 접착도메인(B)(binding domain)과 이종의 작용기서열(functional group, 이하 "F"라 함)의 융합(fusion)에 의해 만들어진 단량체인 키메라 재조합 접착도메인(B)-이종작용기(F)융합체([접착도메인(B)-이종작용기(F) 융합체])를 이황화결합 가교로 연결시켜 제작한 이량체인 2배 접착성 키메라 재조합 접착도메인(B)-이종작용기(F) 융합체 ([접착도메인(B)-이종작용기(F) 융합체]2) 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

보다 자세하게는, 접착도메인(B) 끝으로부터 연장되어 이종작용기(F)로 이어지는 연장 아미노산 서열(Ext)은 접착도메인(B)과 작용기(F)를 융합시키며, 이 연장사슬(Ext)에는 사슬내쪽이 없는 시스테인(cysteine)이 포함되어 있어 두 개의 단량체 사이의 사슬내쪽이 없는 시스테인의 산화에 의해 이황화결합 가교가 형성됨으로써 이량체가 이루어지며, 또한 이 연장사슬(Ext)에는 이황화결합 가교로 이량체를 이루게 하는 사슬내쪽이 없는 시스테인 중의 마지막 시스테인과 이종작용기(F) 사이의 유연한 아미노산 서열(F1x)이 포함되며, 이 유연사슬(F1x)은 벌키(bulky)하지 않은 아미노산인 GASQEND(글리신, 알라닌, 세린, 글루타민, 글루탐산, 아르파라긴, 아스파르트산)을 포함하는 유연한(flexible) 아미노산 서열로 이루어져 단량체인 키메라 재조합 접착도메인(B)-작용기(F) 융합체가 이량체를 이룰 때 작용기 사이의 입체적 방해를 감소시켜 2배 접착성 이량체를 형성하는 것을 특징으로 한다.

【대표도】

도 1

【색인어】

카메라 재조합 접착도메인-작용기 융합체, 이량체, 사슬내짝이 없는 시스테인, 단량체간 이
황화결합 가교, 연장사슬, 유연사슬, 유연한 아미노산

【명세서】

【발명의 명칭】

이황화결합 가교로 형성된 키메라 재조합 접착도메인-작용기 융합체의 이량체 및 이의 제조 방법 {A Dimer of Chimeric Recombinant Binding Domain-Functional Group Fusion formed via Disulfide-bond-bridge and A Process For Producing The Same}

【도면의 간단한 설명】

도 1은 $[B3(Fd)-Ext(4CF11,16,21)-PE38]_2$ 를 발현시키는 pMH21, pMH22, pMH23와 $B3(Fd)-Ext(AQ4CF16)-PE38$ (hinge 부분에 알라닌을 넣은 plasmid)를 발현시키는 pMHS22의 구조를 나타낸다.

도 2는 PCR에 의한 pMH21,22,23,pMHS22의 작제과정을 나타낸다.

도 3은 플라스미드 pMH21,22,23,pMHS22의 지도를 나타낸다.

도 4는 연장사슬에서 시스테인의 위치에 따른 수득률을 나타내는 그래프이다.

도 5는 최종 정제된 항체-독소를 나타낸다.

도 6은 $[B3(Fab)-ext-PE38]_2$ 의 구조를 나타낸다.

도 7은 Superdex 200 column profile 및 SDS-PAGE analysis 결과를 나타낸다.

도 8은 divalent immunotoxin 및 control molecule scFv-PE40의 세포독성 실험 결과를 나타내는 그래프이다.

도 9는 $[B3(FabH1)-PE38]_2$ 의 구조를 나타낸다.

도 10은 B3(FabH1)-PE38 및 $[B3(FabH1)-PE38]_2$ 의 TSK-GEL G3000SW column의 결과를 나타낸다.

도 11은 BMH 및 BM[PEO]4의 구조를 나타낸다.

도 12는 항체-독소의 구조도를 나타낸다.

도 13은 PCR에 의한 pLSC52의 구축과정을 나타낸다.

도 14는 PCR에 의한 pLSC32의 구축과정을 나타낸다.

도 15는 [B3(Fab-CH3)-PE38R]₂의 Source-Q column profile 및 SDS-PAGE 결과를 나타낸다.

도 16은 [B3(Fab-Fc)-PE38R]₂의 Superdex 200 column profile 및 SDS-PAGE 결과를 나타낸다.

도 17은 [B3(Fab-CH3)-PE38R]₂의 Superdex 200 column profile 및 SDS-PAGE 결과를 나타낸다.

도 18은 [B3(Fab-CH2)-PE38R]₂의 Superdex 200 column profile 및 SDS-PAGE 결과를 나타낸다.

【발명의 상세한 설명】

【발명의 목적】

【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

- ▷ 본 발명은 접착도메인(binding domain, 이하 "B"라 함)과 이종의 작용기서열(functional group, 이하 "F"라 함)의 융합(fusion)에 의해 만들어진 단량체인 키메라 재조합 접착도메인 (B)-이종작용기 (F) 융합체([접착도메인(B)-이종작용기(F) 융합체])를 이황화결합 가교로 연결 시켜 제작한 이량체인 키메라 재조합 접착도메인(B)-이종작용기(F) 융합체 ([접착도메인(B)-이종작용기(F) 융합체]₂) 및 이의 제조방법에 관한 것이다.
- ▷ 보다 자세하게는, 접착도메인(B) 끝으로부터 연장되어 이종작용기(F)로 이어지는 연장 아미노산 서열(Ext)이 접착도메인(B)과 작용기(F)를 융합시키며, 이 연장사슬(Ext)에는 사슬내쪽이 없는 시스테인(cysteine)이 포함되어 있어 두 개의 단량체 사이의 사슬내쪽이 없는 시스테인의 산화에 의해 이황화결합 가교가 형성됨으로써 이량체가 이루어지며, 또한 이 연장사슬(Ext)에는 이황화결합 가교로 이량체를 이루게 하는 사슬내쪽이 없는 시스테인 중의 마지막 시스테인

과 이종작용기(F) 사이의 유연한 아미노산 서열(F1x)이 포함되며, 이 유연사슬(F1x)은 벌키(bulky)하지 않은 아미노산인 GASQEND(글리신, 알라닌, 세린, 글루타민, 글루탐산, 아르파라간 또는 아스파르트산)을 포함하는 유연한(flexible) 아미노산 서열로 이루어져 단량체인 키메라 재조합 접착도메인(B)-작용기(F) 융합체가 이량체를 이룰 때 작용기 사이의 입체적 방해를 감소시켜 이량체를 형성하는 것을 특징으로 한다.

- 본 발명의 키메라 재조합 접착도메인(B)-이종작용기(F) 융합체 이량체는 단량체 사이의 이황화결합 가교로 형성되어 2배 접착성을 갖게 한 최초의 경우이며, 이러한 이량체는 단량체에 비해 표적에 대한 작용 효과가 우수하며, 상기 특징을 갖는 유연사슬(F1x)을 포함하는 경우 생성 수득율이 높다.
- > 접착성서열과 이종의 작용기의 융합체는 매우 많은 접착성서열과 매우 많은 이종의 작용기 사이에 만들어져 왔다.
- > 항체는 접착성서열로 사용된 대표적인 예이다 [참조: Hall, Walter A., Immunotoxin Method and Protocols, Method in Molecular Biology Vol 166, Humana Press, Totowa, New Jersey]. 항체는 그 접착친화도와 접착특이성을 유지하면서 여러 가지 형태로 접착부위를 변형-재조합하여 연구되어져 왔다. 그 예로는 scFv, pFv, sdFv, Fab, L(경쇄만을 1개 이용한 것), LL(경쇄만을 2개 이용한 것), H(중쇄만을 1개 이용한 것), HH(중쇄만을 2개 이용한 것), diabody, triabody, tetrabody, double headed antibody 등을 등 수 있다 [참조: Brinkmann, U., et al., J. Mol. Biol. 268, 107-117, 1997, Chaudhary, V. K., et al., Nature 339, 394-397, 1989, Webber, K. O., et al., Mol. Immunol. 4, 249-258, 1995, Yokota, T., et. al., Cancer Res. 52, 3402-3408, 1992, Kreitman R. J., et. al., Leukemia 7(4), 553-562, 1993, Pluckthun A. and Pack P., Immunotechnology 3, 83, 1997, Holliger, P., et. al., Protein

Eng. 9, 299-305, 1996, Atwell J., et. al., Protein Eng. 12, 597-604, 1999, Iliades P., et. al., FEBS Lett. 409, 437, 1997]. 이러한 항체의 접착부위 조각들은 항체 기능만을 독자적으로 작용기와의 융합이 없이 사용되거나, 또는 생리활성을 갖는 작용기(F)와 화학적 또는 유전학적 융합을 시켜 작용기(F)의 기능을 특이적으로 표적에 전달하여 생리적 작용을 일으키는 제재를 만드는 데 사용되어 왔다.

또한 접착성서열로 사용된 예는 각종 리간드, 또는 그 리간드의 접착성을 갖는 일부 조각, 예를 들어 TGF alpha, TGF beta, IL2, IL6, TNF, GMSCF 등등, 또한 각종 리간드 수용체 또는 그 수용체의 접착성을 갖는 일부 조각, 예를 들어 TBP1, TBP2, IFN alpha 또는 beta 수용체, 고나 도트로핀 수용체 등의 각종 수용체 등이 있다.

➢ 접착도메인과 융합되어 사용되는 작용기는 열거하기에도 매우 많은 종류의 분자들이 사용되어 져 왔다 [참조: Hall, Walter A., Immunotoxin Method and Protocols, Method in Molecular Biology Vol 166, Humana Press, Totowa, New Jersey]. 그 예로서 약물전구체변환, 물질검출, 물질분해, 물질생성 등의 작용을 하는 각종 효소, 세포살상효과를 갖는 독소작용기 등을 포함하는 단백질, 유전자치료를 위한 바이러스 등의 생체, DNA 전달을 위한 양이온꼬리체 화합물, 약물작용을 위한 약물화합물 등의 화합물, 약물전달을 위해 만든 화공학적 산물인 라이포좀 (liposome), 표적분자의 실시간 검출을 위한 바이오센서 등을 들 수 있고, 융합하여 사용할 수 있는 대상은 상상할 수 없을 만큼의 다양한 분자가 가능하다 [참조: (Hudson, P. J., Curr Opin Immunol 11(5), 548-5, 1999)(Bagshawe, K. D., et al., Curr Opin Immunol 11(5), 579-83, 1999)].

➢ 특정 세포에 특이적으로 접착하는 접착성서열(binding domain)로 항체를 이용하여 항체에 세포살상인자를 화학적 또는 유전적 방법으로 연결하여 만든 인공물질로서 항체-독소작용기 융합

체가 있다 [참조: Cobb, P.W., et al., *Semin Hematol* 29, 6-13, 1992]. 항체-독소작용기 융합체의 아이디어는 80년대 초에 처음 시작되었다. 대개의 암세포는 세포표면에 암세포에 특이한 항원 또는 정상세포에도 있으나 정상세포보다는 높은 밀도로 존재하는 항원을 가지고 있으며, 이를 인식하는 항체분자가 개발되어지면서 항체-독소작용기 융합체는 기존의 항암제보다 월등한 암세포 특이성을 갖는 항암제로서 암치료에 성공하리라 기대되었다.

초기의 항체-독소작용기 융합체는 항체와 독소작용기를 단백질 중합 화학반응에 의해 연결한 형태였는데 유전자 재조합 기술이 발전함에 따라 여러 종류의 재조합 단백질 형태로 제작되었다. 단백질 중합반응에 의해 만들어진 초기의 항체-독소작용기 융합체(mAb-toxin)는 혈장 내에서의 안정도가 높고 임상실험에서 암조직의 완전한 소멸을 보여주었으나 [참조: Pai, L.H., et al., *Cancer Res* 52, 3189-93, 1992] 단백질 중합반응 과정 중 일어난 항체분자의 손상과 화학반응 과정에서의 부반응에 의해 생긴 불활성 물질로 인해 불균일한 생성물로 얻어지는 문제점이 있었다. 또한, 분자의 크기가 매우 커서 암조직 침투력이 낮을 것이라는 우려가 있었다.

> 초기의 항체-독소작용기 융합체가 가지는 이러한 문제점은 유전자 재조합 기술을 이용하여 많은 것이 해결되어질 수 있었다. 유전공학기술은 항체-독소작용기 융합체에 필수적으로 요구되는 부분들만을 유전적으로 결합시킬 수 있는 기술을 제공하여, 매우 균일한 물질로 정제해 내는 것을 가능하게 해 주었고, 점차 분자량이 작은 재조합 단백질들의 설계-제작을 가능하게 하였다 [참조: Pai, L.H., et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 88, 3358-3362, 1991]. 항체-독소작용기 융합체로서 기능을 하기 위해 필요한 최소한의 부위로 항체분자의 결합부위인 가변영역(고정영역은 제외)과 독소작용기분자의 독성효소부분(독소작용기분자의 세포에 대한 결합부위를 제외)[참조: Kondo, T., et al., *J Biol Chem* 263, 9470-9475, 1988]을 사용하여 왔는데, 현재는 이러한 항체분자의 결합부위와 독소작용기분자의 독성효소부위 자체까지도 더 좋은 활성을

위해 변형시켜 유도체를 만들고 있다 [참조: (Pastan, I., et al., *Science* 254, 1173-1177, 1991)(Pastan, I., et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 88, 3358-3362, 1991)(Vitetta, E.S., et al., *Cell Biology* 2, 47-58, 1991)(Allured, V.S., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83, 1320-1324, 1986)(Hwang, J., et al., *Cell* 48, 129-136, 1987)].

현재까지 유전자 재조합기술을 이용하여 변형되어진 항체분자의 결합부위의 형태는 크게 4종류로 나누어 볼 수 있다. 항체분자의 결합부위 중 최소한의 단위로 여겨지는 VH와 VL을 15개 아미노산의 폴리펩타이드 링커 (Gly_4Ser)₃으로 연결한 scFv(single chain Fv) 형태 [참조: Buchner, J., et al., *Anal Biochem* 205, 263-70, 1992], VH와 VL을 이황화결합으로 연결한 dsFv (disulfide-stabilized Fv) 형태, VH와 VL을 베이스 루프(base loop)로 연결한 pFv(permuted Fv) 형태, Fab형태 등이 그것이다. scFv-독소작용기 형태는 현재까지 제작되어진 항체결합부위가 가장 작은 분자량을 갖는 것으로서 scFv-독소작용기는 그 작은 크기로 인해 암조직 침투능력이 탁월하여 암조직 살상효과가 클 것으로 기대되어졌다. 그러나, 실험과정상의 낮은 생산효율성 [참조: (Buchner, J., et al., *Anal Biochem* 205, 263-70, 1992) (Brinkmann, U., et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 88, 8616-8620, 1991)]과 동물혈액순환계에서의 짧은 반감기 수명이 문제점으로 나타나고 있었으며 [참조: Brinkmann, U., et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 89, 3065-3069, 1992] 실제 임상실험에서 관찰된 결과도 치료의 효과를 전혀 나타내지 못했다.

» scFv-독소작용기 형태와 유사한 크기라는 장점을 가지면서 동물혈액순환계에서의 안정성의 향상을 위해 고안되어진 형태가 dsFv-독소작용기이다. 이 형태의 항체-독소작용기 응합체는 동물혈액순환계 내에서 scFv-독소작용기 형태보다 더 안정했으나, 생체 밖에서 배양된 암세포에 대한 세포살상효과는 scFv-독소작용기와 비슷한 결과를 보였다 [참조: (Pastan, I., et al.,

Science 254, 1173-1177, 1991)(Pastan, I., et al., Cancer Research 51, 3781-3787, 1991)].

동위원소로 표지된 dsFv-독소작용기를 이용하여 실험동물에서 dsFv-독소작용기의 분산을 추적한 결과 15분이 지난 후 동물의 체내에서는 10% 정도의 양만이 남아있음을 보였고 암조직으로의 축적은 45-90분 정도가 걸린 후에 최고 값에 도달함을 보았다 [참조: Choi, C., et al., Cancer Res 55, 5323-9, 1995]. 이 실험은 dsFv가 암조직에 접착하여 최대한 축적되는데 필요한 시간보다 빠르게 동물체외로 배설되어 나가 혈액순환계에서 사라지는 것을 보여주었다.

scFv-독소작용기와 dsFv-독소작용기로도 극복할 수 없는 경우에 적용 가능하도록 고안되어진 형태가 pFv로, 이는 항체분자의 VL의 3과 3b사이의 β -스트랜드와 VH의 3과 3b사이의 β -스트랜드를 연결한 것이다 [참조: Brinkmann, U., et al., J Mol Biol 268, 107-17, 1997].

그러나, 이 형태의 항체-독소작용기 융합체는 여전히 짧은 반감기 수명과 낮은 생산효율성, scFv-독소작용기, dsFv-독소작용기 형태와 비슷한 또는 오히려 낮은 세포살상효과를 보여주었다. 위에서 나열한 Fv 유도체 형태의 항체-독소작용기 융합체는 모두가 동물혈액순환계에서 분자의 열역학적 안정성이 낮음으로 인해 그 구조가 불안정하여 단백질분해효소의 공격을 쉽게 받아 너무 빨리 분해되거나, 크기가 너무 작아 콩팥을 통하여 너무 빨리 배설되어 혈액순환계에 적절한 시간동안 머무르지 못 하는 것에 임상실험 결과인 치료효과가 전무함의 원인이다.

이러한 여러 문제점을 극복할 가능성이 있는 분자로서 항체분자의 Fab 부분을 항체-독소작용기 융합체에 이용하는 Fab-독소작용기 형태의 재조합 항체-독소작용기 융합체가 만들어졌다 [참조: (Ghetie, M.A., et al., 1991)(Kreitman, R.J., et al., Cancer Res 53, 819-25, 1993)(Choe, M., et al., Cancer Res 54, 3460-7, 1994)(Kreitman, R.J. et al., Int J Cancer 57, 856-64, 1994)]. 이 분자는 재조합 항체-독소작용기 융합체임에도 동물혈장 내에서의 활성도 반감기가 단백질중합반응에 의해 제작되어진 초기항체-독소작용기 융합체(mAb-toxin)와 비

슷한 수준까지 길어졌음을 보이고, scFv-독소작용기, dsFv-독소작용기, pFv-독소작용기보다 구조적으로 더 안정함을 보였다 [참조: (Choe, M., et al., Cancer Res 54, 3460-7, 1994)(Kreitman, R.J., et al., Int J Cancer 57, 856-64, 1994)]. 또한, 생산과정상의 재접힘 단계의 생산효율도 최고 10배정도 높은 것으로 나타났다 [참조: (Buchner, J., et al., Bio/Technology 9, 157-162, 1991)(Buchner, J., et al., Anal Biochem 205, 263-70, 1992)]. Fab-독소작용기가 scFv-독소작용기보다 혈장 내의 활동도가 높은 점에 비하여 암치료효과는 항체의 종류에 따라 scFv-독소작용기에 비해 좋거나 또는 크게 차이가 나지 않는 결과를 보였는데, 크게 차이가 나지 않는 경우는 특정의 Fab-독소작용기가 scFv-독소작용기 보다 재접힘과정에서 더 큰 크기의 분자이어서 재접힘과정 동안 Fab의 각 부위의 4차 구조의 형성이 완전하게 되지 않고, 사슬내이황화결합 (intrachain disulfide bond)이 2개 더 많아 이황화결합 형성의 문제점이나 뒤섞임 (disulfide bond scrambling)의 가능성이 높고, 중쇄와 경쇄 사이의 사슬간 이황화결합 (interchain disulfide bond)이 있어 이를 이루는 시스테인이 또한 이황화결합 형성의 문제점이나 뒤섞임 (disulfide bond scrambling)의 가능성을 높여 분자의 입체구조가 완전히 형성되지 못하여 항원에 대한 결합 친화도 세기가 정상적인 세기를 갖지 못한 분자가 생성물에 섞여 있을 가능성이 원인임으로 해석된다 [참조: Choe, M., et al., Cancer Res 54, 3460-7, 1994].

> 이처럼 Fab-독소작용기가 scFv-독소작용기보다 결합세기가 약한 경우가 있는 것은 Fab-독소작용기 자체에 결함이 있기보다는 Fab-독소작용기의 생산-정제과정에서 scFv-독소작용기의 방법을 사용하였기 때문에 활성이 없는 입체구조의 분자와 이황화결합의 형성이 잘 못되거나 뒤섞임이 일어난 분자가 생길 가능성이 있고 이를 검색하여 분리-제거하기가 매우 어렵기 때문이다. Fab-독소작용기에 알맞은 정제과정을 개발한다면 이것은 극복되어질 수 있는 문제이

다. 이러한 여러 결과를 보면, 현재까지 제작되어진 항체-독소작용기 융합체 중 분자 구조면에서 열역학적으로 안정하고 동물혈액순환계에서 반감기가 적절한 것으로 판단되어지는 것이 Fab-독소작용기 형태이다. 이에 대한 생화학적 설명은, Fab에 있는 고정영역 CH1과 CL이 상호친화성이 있어 소수성부위의 용액으로의 노출이 적으며 단백질 분해효소의 공격을 적게 받고, 중-경 사슬간의 이황화결합이 Fab의 4차 구조에 높은 안정성을 부여하기 때문이며 이로 인하여 분자의 분해 -소멸에 대한 저항성이 높을 것이다라는 설명이 가능하다. 임상실험의 결과는 단백질 중합반응에 의해 만들어진 초기의 mAb-독소작용기의 경우 말기 암환자에게 투여했을 때 완전치료가 된 환자가 관찰이 되는데 비하여 [참조: Pai, L.H., et al., Nat Med 2, 350-3, 1996] scFv-독소작용기의 경우에서는 전혀 치료효과를 보지 못하였고, 이 결과는 항체-독소작용기 융합체를 암치료제로 성공시키기 위해서 가장 중요한 문제는 혈장내의 안정도와 친화도라는 것을 말해 주고 있다.

- > 따라서, 동물혈액순화계 내에서 안정도 및 친화도가 개선되어 표적에 대한 작용 효과가 높고 또한 수득률이 향상된 새로운 항체-독소작용기 융합체가 개발될 필요가 있다. 이러한 과제가 해결해야 하는 문제점은 안정도를 높이기 위하여 분자구조를 견고하게 하기 위하여 분자 구조에 이황화결합을 증가시키는 것이 한 방법인데 이런 경우에 이황화결합을 이루는 시스테인간에 결합이 짹이 맞지 않게 뒤섞이거나 잘 형성이 되지 않고 활성이 있는 입체구조를 갖지 않는 불활성구조가 많이 만들어져 원하는 분자가 만들어지지 않거나 수득율이 매우 낮다는 점이다.
- > 위에서 설명한 항체-독소작용기의 분자들은 항체접착도메인과 독소작용기의 위치를 뒤바꾸어 아미노 말단에 독소작용기를 카르복시 말단에 항체접착도메인을 위치시키어 독소작용기-항체접착도메인의 형태로도 만들어져 실험되어 비슷한 결과들을 보여주었다.

또한 접착활성도를 늘리기 위해 접착서열을 복수로 넣은 몇 가지 항체 유도체들이 만들어 졌는데, 이들로서는 diabody, triabody, tetrabody, double headed antibody 등이 있다 [참조: Takemura S., et al., *Cancer Immunol Immunother.* 51(1):33-44. 2002] 이들은 항체의 접착성 서열만을 이용하여 접착성서열의 숫자를 2배, 3배, 4배로 하여 접착도메인을 구성하는 사슬간의 친화도를 이용하여 복수의 접착도메인을 갖도록 하여 이루어진 것이다. 이들은 접착가수가 2가, 3가, 4가로서 접착친화도의 증가를 보이는데, 본 발명에서와 같이 이러한 분자를 이종의 작용기와 연결하여 키메라 융합체로 생성한 예는 보고된 바가 없다. 이러한 분자들에 작용기 를 융합시키는 것은 융합에 필요한 접착도메인과 작용기 사이를 어떻게 하여 접착도메인과 작 용기 사이에 상호방해가 일어나지 않게 하는가가 매우 어려운 과제이고 이에 의해 성공여부가 결정될 것을 당업자들은 잘 알고 있다. 연장사슬이 재접힘과정에서 거대사슬들의 입체구조형 성을 조금이라도 방해하거나 거대 사슬간에 상호방해가 일어난다면 활성이 있는 분자를 전혀 얻을 수 없기 때문이다.

> 또한 연장사슬에 사슬내 이황화결합의 시스테인 짹(intrachain disulfide bond counterpart cysteine)이 없는 시스테인을 넣을 경우 이 시스테인이 사슬내의 자기 짹이 있는 (맞는 짹이 있는) 다른 시스테인과 이황화결합을 하여 원래의 사슬내 이황화결합을 짹이 맞게 형성하지 못하게 함으로써 분자의 입체구조를 파괴하고 분자의 활성을 상실케 할 가능성이 크다. 또한 연장사슬이 견고한 구조 (rigid structure)를 갖지 못하고, 유연한 아미노산이 많이 들어 있어 일정구조를 갖지 않는 유연한 사슬을 포함하는 경우 이러한 유연한 구조의 사슬에 있는 사슬내 짹이 없는 시스테인은 이웃한 거대분자구조 내의 사슬내짜이 있는 시스테인과 뒤섞여 이황화결합을 할 것이라 생각할 수밖에 없다. 만약에 성공적인 연장사슬과 사슬내짜이 없는 시스테인 의 삽입이 관찰된다고 하여도 당업자들은 사슬내짜이 없는 시스테인이 우연히 이웃한 거대 분

자의 3차, 4차 구조의 형성에 상호방해를 하지 않는 특별한 경우를 발견한 것이라 생각할 것이다.

위와 같이 이제까지 알려진 지식으로 인해 제한된 한계를 뛰어 넘는 새로운 지식이 생산된다면 당업자들은 위의 문제를 극복하고 이러한 분자를 접착도메인(B)으로 사용하는 이종작용기와의 융합체를 만들어 이황화결합으로 가교된 이량체를 만드는 것이 가능하다.

한편, Bera, T. K. 등에 의해 여러 가지 구조의 분자에 대한 비교 연구가 있었으나 [참조: Bera, T.K., et al., *Bioconjug Chem* 9(6), 736-4, 1998] 항체-독소작용기 형태의 항체-독소작용기 융합체를 이황화결합으로 가교시켜 이량체 형태의 [항체-독소작용기]2를 형성하도록 하여 2배 접착성분자를 생성했다는 보고는 없다. 이와 같이 당업자들은 항체와 같이 거대한 서열과 독소작용기와 같은 거대한 서열사이에 연장사슬을 넣고, 연장사슬 내에 사슬내짝이 없는 시스테인을 넣어 이황화결합 가교에 의한 이량체 형성을 하려하는 시도는 단백질 분자의 3차, 4차 구조의 형성이 어떻게 하여 형성되는가 하는 단백질 접힘 현상에 대한 지식이 확보될 때 성공하게 되리라고 생각하여왔다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

> 본 발명의 기술적 과제는 접착도메인(B)(binding domain)과 이종의 작용기서열 (functional group)의 융합에 의해 만들어진 단량체인 키메라 재조합 접착도메

인(B)-이종작용기(F) 융합체([접착도메인(B)-이종작용기(F) 융합체])를 이황화결합 가교로 연결시켜 제작한 이량체인 2배 접착성 키메라 재조합 접착도메인(B)-이종작용기(F) 융합체 ([접착도메인(B)-이종작용기(F) 융합체]2)를 개발하고, 이 과정에서 사용된 접착도메인(B) 끝으로부터 연장되어 이종작용기(F)로 이어지는 연장 아미노산 서열(Ext)은 접착도메인(B)과 작용기(F)를 융합시키며, 이 연장사슬(Ext)에는 사슬내쪽이 없는 시스테인(cysteine)이 포함되어 있어 두 개의 단량체 사이의 사슬내쪽이 없는 시스테인의 산화에 의해 이황화결합 가교가 형성됨으로써 이량체가 이루어지며, 또한 이 연장사슬(Ext)에는 이황화결합 가교로 이량체를 이루게 하는 사슬내쪽이 없는 시스테인 중의 마지막 시스테인과 이종작용기(F) 사이의 유연한 아미노산 서열(F1x)이 포함되며, 이 유연사슬(F1x)은 벌키(bulky)하지 않은 아미노산인 GASQEND(글리신, 알라닌, 세린, 글루타민, 글루탐산, 아르파라긴, 아스파르트산)을 포함하는 유연한(flexible) 아미노산 서열로 이루어져 단량체인 키메라 재조합 접착도메인(B)-작용기(F) 융합체가 이량체를 이를 때 작용기 사이의 입체적 방해를 감소시켜 2배 접착성 이량체를 형성하는 것을 특징으로 하는, 2배 접착성 키메라 재조합 접착도메인(B)-이종작용기(F) 융합체의 이량체를 제조함으로써 달성하였다.

【발명의 구성 및 작용】

- ▶ 본 발명은 접착도메인(B)(binding domain)과 이종의 작용기서열(functional group, 이하 "F"라 함)의 융합(fusion)에 의해 만들어진 단량체인 키메라 재조합 접착도메인(B)-이종작용기(F) 융합체([접착도메인(B)-이종작용기(F) 융합체])를 이황화결합 가교로 연결시켜 제작한 이량체인 2배 접착성 키메라 재조합 접착도메인(B)-이종작용기(F) 융합체 ([접착도메인(B)-이종작용기(F) 융합체]2) 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

보다 자세하게는, 접착도메인(B) 끝으로부터 연장되어 이종작용기(F)로 이어지는 연장 아미노산 서열(Ext)은 접착도메인(B)과 작용기(F)를 융합시키며, 이 연장사슬(Ext)에는 사슬내짝이 없는 시스테인(cysteine)이 포함되어 있어 두 개의 단량체 사이의 사슬내짝이 없는 시스테인의 산화에 의해 이황화결합 가교가 형성됨으로써 이량체가 이루어지며, 또한 이 연장사슬(Ext)에는 이황화결합 가교로 이량체를 이루게 하는 사슬내짝이 없는 시스테인 중의 마지막 시스테인과 이종작용기(F) 사이의 유연한 아미노산 서열(F1x)이 포함되며, 이 유연사슬(F1x)은 별키(bulky)하지 않은 아미노산인 GASQEND(글리신, 알라닌, 세린, 글루타민, 글루탐산, 아르파라긴, 아스파르트산)을 포함하는 유연한(flexible) 아미노산 서열로 이루어져 단량체인 키메라 재조합 접착도메인(B)-작용기(F) 융합체가 이량체를 이를 때 작용기 사이의 입체적 방해를 감소시켜 2배 접착성 이량체를 형성하는 것을 특징으로 한다.

- › 본 발명에서 접착도메인(B)이라 함은 접착성 단백질 또는 접착성을 보유하는 조각을 구성하는 아미노산 서열로서 항체, 항체의 조각, 예를 들어 scFv, pFv, sdFv, Fab, L(경쇄만을 1개 이용한 것), LL(경쇄만을 2개 이용한 것), H(중쇄만을 1개 이용한 것), HH(중쇄만을 2개 이용한 것), diabody, triabody, tetrabody, double headed antibody, 각종 리간드, 예를 들어 TGF alpha, TGF beta, IL2, IL6, TNF, GMSCF, 또는 그 리간드의 접착성을 갖는 일부 조각, 각종 리간드 수용체, 예를 들어 인슐린 수용체, TBP1, TBP2, IFN alpha 또는 beta 수용체, 고나도트로핀 수용체 등, 또는 그 수용체의 접착성을 갖는 일부 조각 등, 접착성을 포함하고 있음을 특징으로 하는 서열 등을 말한다.
- › 또한 본 발명에서 이종작용기(F)라 함은 약물전구체변환, 물질검출, 물질분해, 물질생성 등의 작용을 하는 각종 효소, 세포살상효과를 갖는 독소작용기 등을 포함하는 단백질, 유전자치료를 위한 바이러스 등의 생체, DNA 전달을 위한 양이온꼬리체 화합물, 약물작용을 위한 약물화

합물 등의 화합물, 약물전달을 위해 만든 화공학적 산물인 라이포좀(liposome), 표적분자의 실시간 검출을 위한 바이오센서, 또는 프로드러그 등의 작용기를 말한다.

본 발명의 2배 접착성 키메라 재조합 접착도메인(B)-이종작용기(F) 융합체 이량체는 단량체 사이의 이황화결합 가교로 형성되어 2배 접착성을 갖게 한 최초의 경우이며, 이러한 이량체는 단량체에 비해 표적에 대한 작용 효과가 우수하며, 상기 특징을 갖는 유연사슬(F1x)을 포함하는 경우 생성수득율이 높다.

즉, 한 가지 관점으로서, 본 발명은 접착도메인(B)과 이종의 작용기서열(F)의 융합에 의해 만들어진 단량체인 키메라 재조합 접착도메인(B)-이종작용기(F) 융합체([접착도메인(B)-이종작용기(F) 융합체])를 이황화결합 가교로 연결시켜 이량체인 2배 접착성 키메라 재조합 접착도메인(B)-이종작용기(F) 융합체 ([접착도메인(B)-이종작용기(F) 융합체]2)로 만들기 위하여, 접착도메인(B) 끝으로부터 연장되어 이종작용기(F)로 이어지는 연장 아미노산 서열(Ext)이 접착도메인(B)과 작용기(F)를 융합시키며, 이 연장사슬(Ext)에는 사슬내짝이 없는 시스테인이 포함되어 있어 두 개의 단량체 사이의 사슬내짝이 없는 시스테인의 산화에 의해 이황화결합 가교가 형성됨으로써 이량체가 이루어지며, 또한 이 연장사슬(Ext)에는 이황화결합 가교로 이량체를 이루게 하는 사슬내짝이 없는 시스테인중의 마지막 시스테인과 이종작용기(F) 사이의 유연한 아미노산 서열(F1x)이 포함되며, 이 유연사슬(F1x)은 벌키(bulky)하지 않은 아미노산인 GASQEND(글리신, 알라닌, 세린, 글루타민, 글루탐산, 아르파라긴, 아스파르트산)을 포함하는 유연한(flexible) 아미노산 서열로 이루어져, 단량체인 키메라 재조합 접착도메인(B)-작용기(F) 융합체가 이량체를 이루 때 작용기 사이의 입체적 방해를 감소시켜 2배 접착성 이량체를 형성하는 것을 특징으로 하는 2배 접착성 키메라 재조합 접착도메인(B)-이종작용기(F) 융합체 이량체를 제공한다.

다른 관점으로서, 본 발명은 접착도메인(B)과 이종의 작용기서열(F)의 융합에 의해 만들어진 단량체인 키메라 재조합 접착도메인(B)-이종작용기(F) 융합체([접착도메인(B)-이종작용기(F) 융합체])를 이황화결합 가교로 연결시켜 이량체인 2배 접착성 키메라 재조합 접착도메인(B)-이종작용기(F) 융합체 ([접착도메인(B)-이종작용기(F) 융합체]2)를 생성하는데 사용되는 폴리펩타이드를 제공한다.

또 다른 관점으로서, 본 발명은 접착도메인(B)과 이종의 작용기서열(F)의 융합에 의해 만들어진 단량체인 키메라 재조합 접착도메인(B)-이종작용기(F) 융합체([접착도메인(B)-이종작용기(F) 융합체])를 이황화결합 가교로 연결시켜 이량체인 2배 접착성 키메라 재조합 접착도메인(B)-이종작용기(F) 융합체 ([접착도메인(B)-이종작용기(F) 융합체]2)를 생성하는데 사용되는 폴리펩타이드를 코딩하는 유전자를 포함한 재조합 플라스미드를 제공한다.

본 발명의 설명이 밝혀두어야 할 것은 설명에 첨부한 접착도메인-작용기 융합체 단백질에 대한 DNA 서열뿐만 아니라, 같은 단백질 서열을 생산해 낼 수 있는 실질적으로 동일한 핵산서열을 포함하는 DNA 분자도 본 발명에 포함된다는 것이다. 실질적으로 동일한 핵산서열은 아미노산에 대한 유전자 코돈을 다른 것을 사용하여 같은 아미노산 서열을 생산할 수 있는 모든 핵산 서열을 포함하는 것이다.

본 발명의 키메라 재조합 접착도메인-작용기 융합체를 제조하기 위하여 대개는 해당 단백질 서열을 생산해 줄 수 있는 유전자를 갖고 있는 클론들로부터 해당유전자에 대한 특이한 올리고뉴클레오티드 프라이머들을 만들어 융합체를 구성할 유전자를 PCR 방법을 이용하여 얻는다.

본 발명의 키메라 재조합 접착도메인-이종작용기(F) 융합체의 발현은 적당한 발현벡터를 사용하여 고등한 진핵 세포 (예를 들어, 효모, 곤충 또는 포유동물 세포) 또는 미생물의 원핵 세포에서 실시될 수 있다. 당 분야에 공지된 어떠한 방법도 사용될 수 있다.

예를 들면, 상기한 방법들 어느 한 방법에 의해서 얻어지는 접착도메인-작용기 융합체 단백질에 대한 코딩 서열을 담고 있는 DNA 분자는 당 분야에서 잘 알려진 방법에 의해 적절한 구조의 발현 벡터 내로 삽입 될 수 있다. 이중 사슬형 cDNA는 합성된 DNA 링커를 이용하거나 또는 둥똑한-말단(blunt-ended) DNA 이어주기 방법을 사용하는 제한효소 처리 후 이어주기 또는 같은 핵산 연이어 꼬리 붙이기의 방법등에 의해 플라스미드 벡터들에 넣어주게 된다. DNA연결 효소(ligase)들은 DNA 분자들을 연결하는데 사용되며, 원치 않는 연결 산물은 알카리성 탈인산 효소로 처리하는 것에 의해 줄여 줄 수 있다.

- › 원하는 단백질을 발현할 수 있게 하기 위하여, 발현 벡터는 원하는 유전자에 그 유전자의 mRNA로의 배껴쓰기와 단백질로의 옮겨쓰기에 대한 통제정보를 갖고 있는 특정의 핵산 서열이 원하는 단백질의 유전자가 잘 발현이 되고 단백질의 생산이 가능하도록 원하는 유전자에 연결되어 있게 갖고 있어야 한다. 먼저 유전자가 전사되기 위하여, RNA 중합효소가 인식 가능한 프로모터 서열이 앞에 있어야 한다. 이 프로모터에 RNA 중합효소가 접합하여 배껴쓰기과정을 개시한다. 일반적으로 사용되는 프로모터들은 다양하며, 이들은 상이한 효율로 작용한다.
- › 또 다른 관점으로서, 본 발명은 접착도메인(B)과 이종의 작용기서열(F)의 융합에 의해 만들어진 단량체인 키메라 재조합 접착도메인(B)-이종작용기(F) 융합체([접착도메인(B)-이종작용기(F) 융합체])를 이황화결합 가교로 연결시켜 이량체인 2배 접착성 키메라 재조합 접착도메인(B)-이종작용기(F) 융합체 ([접착도메인(B)-이종작용기(F) 융합체]2)를 생성하는데 사용되는

폴리펩타이드를 코딩하는 유전자를 포함한 재조합 플라스미드를 포함한 숙주 세포를 제공한다.

진핵 숙주의 경우, 숙주의 특성에 따라 서로 다른 배껴쓰기와 옮겨쓰기 통제서열들이 사용될 수 있다. 이들은 많은 양의 발현(high expression)을 갖는 특정의 유전자와 관련된 통제 신호(regulatory signal)들인데, 아데노 바이러스, 소의 유두종 바이러스, 유인원 바이러스 등과 같은 바이러스성 원료로부터 얻어질 수도 있다. 그 예로는 헤르페스 바이러스의 TK 프로모터, SV40 초기발현프로모터(early promoter), 효모의 gal4 유전자 프로모터 등이 있다. 전사 개시 통제 신호들은 발현억제와 발현촉진이 모두 가능하여 유전자의 발현을 조정할 수 있는 것을 선택할 수 있다.

- > 발현 백터가 또는 DNA서열이 일단 발현할 준비가 되면, 이 들을 형질 전환(transformation), 트랜스펙션(transfection), 컨쥬게이션(conjugation), 원형질체 융합(protoplast fusion), 일렉트로포레이션(electroporation), 인산칼슘-침전(calcium phosphate-precipitation), 직접 현미주사(direct microinjection) 등과 같은 여러 가지 적절한 방법들 중의 한 방법에 의해 적절한 숙주 세포 내로 도입될 수 있다.
- > 숙주세포들은 원핵 세포이거나 진핵 세포일 수 있다. 바람직한 것은 진핵세포들, 예를 들면 인간, 원숭이 쥐, 중국햄스터 난소(CHO) 세포와 같은 포유동물 세포들인데, 그 이유는 이러한 세포들이 정확한 부위에서 정확한 폴딩(folding) 또는 글리코실화를 포함하는 단백질 분자들에 대한 단백질 생성 후의 변형을 제공하기 때문이다. 또한 효모세포들은 글리코실화를 포함하는 단백질 생성 후 단백질 변형을 이를 수 있다. 효모에서 원하는 단백질들의 생산에 이용될 수 있는 배껴쓰기 효율이 높고, 높은 재조합 플라스미드 숫자가 유지되는 방법들이 있다.

효모는 클론된 포유동물 유전자의 단백질 분비 신호 선도서열을 인식하고 이 신호를 갖고 있는 펩타이드 (즉, 전구체 펩타이드)를 분비한다.

또 다른 관점으로서, 본 발명은 항접착도메인(B)과 이종의 작용기서열(F)의 융합에 의해 만들어진 단량체인 키메라 재조합 접착도메인(B)-이종작용기(F) 융합체([접착도메인(B)-이종작용기(F) 융합체])를 이황화결합 가교로 연결시켜 이량체인 2배 접착성 키메라 재조합 접착도메인(B)-이종작용기(F) 융합체 ([접착도메인(B)-이종작용기(F) 융합체]2)를 생성하는데 사용되는 폴리펩타이드를 코딩하는 유전자를 갖고있는 재조합 플라스미드를 포함한 숙주 세포를 배양하여 이량체인 2배 접착성 키메라 재조합 항체-이종작용기(F) 융합체를 구성하는 폴리펩타이드를 생성하고, 상기 생성된 폴리펩타이드를 혼합하여 재접힘시키는 단계를 포함하여, 2배 접착성 키메라 재조합 항체-이종작용기(F) 융합체의 이량체를 제조하는 방법을 제공한다.

- > 또 다른 관점으로서, 본 발명은 2배 접착성 키메라 재조합 접착도메인(B)-이종작용기(F) 융합체 이량체를 포함함을 특징으로 하는 약제학적 조성물을 제공한다.
- > 또 다른 관점으로서, 본 발명은 2배 접착성 키메라 재조합 접착도메인(B)-이종작용기(F) 융합체 이량체를 포함함을 특징으로 하는 ?????????(보충설명 부탁드립니다)을 제공한다.
- > 본 발명의 2배 접착성 키메라 재조합 접착도메인(B)-작용기(F) 융합체는 이량체로서 하기와 같은 구조식으로 표시할 수 있다:
 - ▷ [접착도메인(B)-Ext(F1x)-F]2
 - ▷ 상기식에서, 접착도메인(B)(binding sequence)이라 함은 접착성 단백질 또는 접착성을 보유하는 조각을 구성하는 아미노산 서열을 나타내고;

Ext는 연장사슬(Ext, extension sequence)로서 접착도메인(B) 끝으로부터 연장되어 이종작용기(F, functional group)로 이어지는 연장 아미노산 서열(Ext)이 접착도메인(B)과 작용기(F)를 융합시키며, 이 연장사슬(Ext)에는 사슬내쪽이 없는 시스테인(cysteine)이 포함되어 있어 두 개의 단량체 사이의 사슬내쪽이 없는 시스테인의 산화에 의해 이황화결합 가교 가교가 형성됨으로써 이량체가 이루어지며, 또한 이 연장사슬(Ext)에는 이황화결합 가교로 이량체를 이루게 하는 사슬내쪽이 없는 시스테인중의 마지막 시스테인과 이종작용기(F) 사이의 유연한 아미노산 서열(Flx, flexible sequence)이 포함되며, 이 유연사슬(Flx)은 별키(bulky)하지 않은 아미노산인 GASQEND(글리신, 알라닌, 세린, 글루타민, 글루탐산, 아르파라간, 아스파르트산)을 포함하는 유연한(flexible) 아미노산 서열로 이루어져 있고;

- F는 효소, 독소작용기단백질, 바이러스 등의 생체, 화합물, 약물작용을 위한 약물화합물, 라이포좀, 바이오센서, 프로드러그 등과 같은 작용기(F, functional group)를 나타낸다 [참조: (Farah, R. A., et al., Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr. 8, 321-356, 1998)(Trail, P. A., et al., Science 261, 212-215, 1993)(Hinman, L. M., et al., Cancer Res. 53, 3336-3342, 1993)(Pastan, I. Biochim. Biophys. Acta 1333, C1-C6, 1997)(Kreitman, P. J., et al., J. Clin. Oncol. 18, 1622-1636, 2000)(Zalutsky, M. R. & Vaidyanathan, G. Curr. Pharm. Des. 6, 1433-1455, 2000)(Goldenberg, D. M. in Clinical Uses of Antibodies (eds Baum, R. P., et al.)1-13(Kluwer academic, The Netherlands, 1991))(Lode, H. N. & Reisfeld, R. A. Immunol. Res. 21, 279-288, 2000)(Penichet, M. L. & Morrison, S. L. J. Immunol. Methods 248, 91-101, 2001)(Lasic, D.D. & Papahadjopoulos, D. Science 267, 1275-1276, 1995)(Park, J. W., et al., Proc. Natl Acad. Sci. USA 92, 1327-1331,

1995)(Niculescu-Davaz, I., et al., Anticancer Drug Des. 14, 517-538, 1999)(Stoldt, H. S., et al., Eur. J. Cancer 33, 186-192, 1997)].

보다 특정한 양태로서, 본 발명의 2배 접착성 키메라 재조합 접착도메인(B)-작용기(F)융합체는 이량체로서 하기와 같은 구조식으로 표시할 수 있다:

[항체접착도메인-Ext(F1x)-F]2

상기식에서, 항체접착도메인은 항체 또는 항체의 접착성을 보유하는 조각을 구성하는 아미노산 서열을 나타내고;

Ext는 연장사슬(Ext)로서 접착도메인(B) 끝으로부터 연장되어 이종작용기(F)로 이어지는 연장아미노산 서열(Ext)이 접착도메인(B)과 작용기(F)를 융합시키며, 이 연장사슬(Ext)에는 사슬내짝이 없는 시스테인이 포함되어 있어 두 개의 단량체 사이의 사슬내짝이 없는 시스테인의 산화에 의해 이황화결합 가교가 형성됨으로써 이량체가 이루어지며, 또한 이 연장사슬(Ext)에는 이황화결합 가교로 이량체를 이루게 하는 사슬내짝이 없는 시스테인중의 마지막 시스테인과 이종작용기(F) 사이의 유연한 아미노산 서열(F1x)이 포함되며, 이 유연사슬(F1x)은 벌키(Bulky)하지 않은 아미노산인 GASQEND(글리신, 알라닌, 세린, 글루타민, 글루탐산, 아르파라긴, 아스파르트산)을 포함하는 유연한(flexible) 아미노산 서열로 이루어져 있고;

- ▷ F는 효소, 독소작용기단백질, 바이러스 등의 생체, 화합물, 약물작용을 위한 약물화합물, 라이포좀, 바이오센서, 프로드러그 등과 같은 작용기(F)를 나타낸다.
- ▷ 다른 양태로서, 본 발명의 2배 접착성 키메라 재조합 접착도메인(B)-작용기(F)융합체는 이량체로서 하기 구조식으로 표시할 수 있다:
- ▷ [Fab-Ext(F1x)-F]2

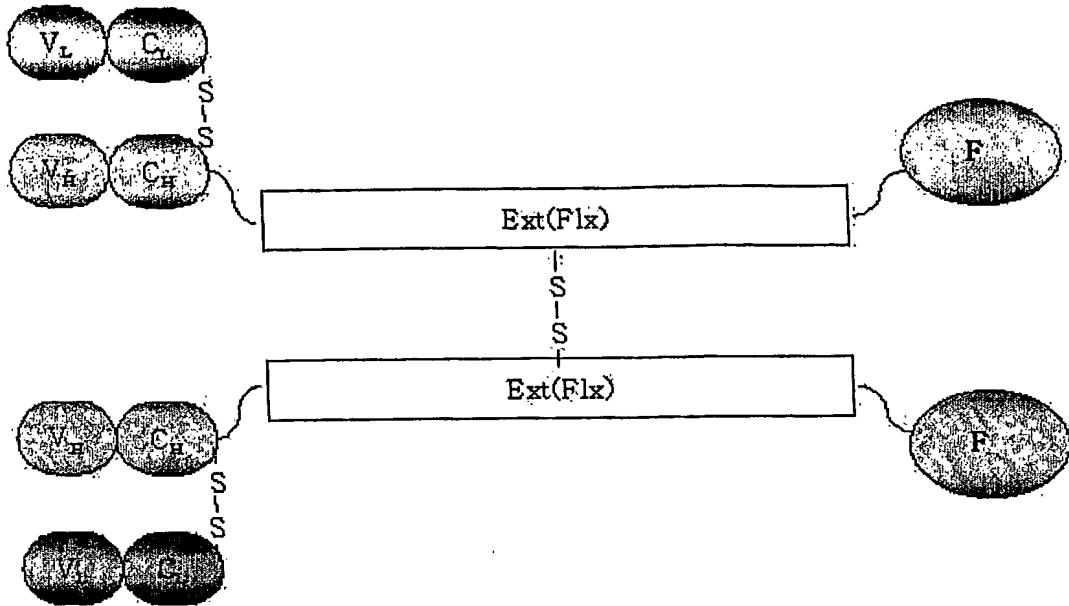
상기식에서, Fab는 항체의 Fab 단편을 나타내고;

Ext는 연장사슬(Ext)로서 접착도메인(B) 끝으로부터 연장되어 이종작용기(F)로 이어지는 연장 아미노산 서열(Ext)이 접착도메인(B)과 작용기(F)를 융합시키며, 이 연장사슬(Ext)에는 사슬 내쪽이 없는 시스테인이 포함되어 있어 두 개의 단량체 사이의 사슬내쪽이 없는 시스테인의 산화에 의해 이황화결합 가교가 형성됨으로써 이량체가 이루어지며, 또한 이 연장사슬(Ext)에는 이황화결합 가교로 이량체를 이루게 하는 사슬내쪽이 없는 시스테인중의 마지막 시스테인과 이종작용기(F) 사이의 유연한 아미노산 서열(F1x)이 포함되며, 이 유연사슬(F1x)은 벌키(Bulky)하지 않은 아미노산인 GASQEND(글리신, 알라닌, 세린, 글루타민, 글루탐산, 아르파라긴, 아스파르트산)을 포함하는 유연한(flexible) 아미노산 서열로 이루어져 있고;

F는 효소, 독소작용기단백질, 바이러스 등의 생체, 화합물, 약물작용을 위한 약물화합물, 라이포좀, 바이오센서, 프로드리그 등과 같은 작용기(F)를 나타낸다.

또 다른 양태로서, 본 발명의 2배 접착성 키메라 재조합 접착도메인(B)-작용기(F)융합체는 이량체로서 하기와 같이 표시할 수 있다:

> [참고도 1]

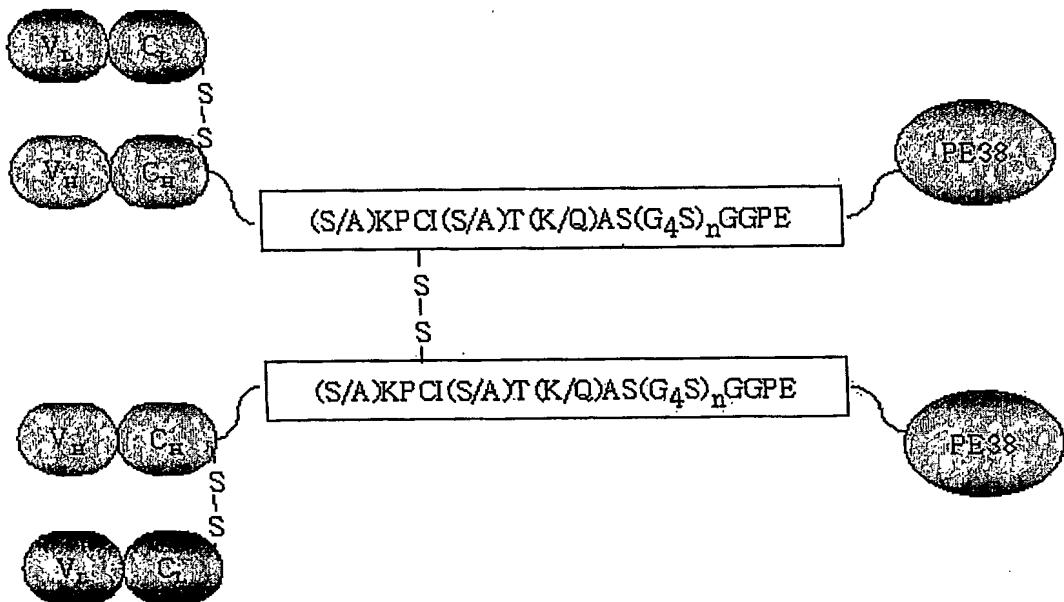


- > 상기식에서, V_L 은 단일클론 항체의 경쇄의 가변영역을 나타내고;
- > C_L 은 단일클론 항체의 경쇄의 고정영역을 나타내고;
- > V_H 는 단일클론 항체의 중쇄의 가변영역을 나타내고;
- > C_H 는 단일클론 항체의 중쇄의 고정영역을 나타내고;
- > Ext는 연장사슬(Ext)로서 접착도메인(B) 끝으로부터 연장되어 이종작용기(F)로 이어지는 연장 아미노산 서열(Ext)이 접착도메인(B)과 작용기(F)를 융합시키며, 이 연장사슬(Ext)에는 사슬내짝이 없는 시스테인이 포함되어 있어 두 개의 단량체 사이의 사슬내짝이 없는 시스테인의 산화에 의해 이황화결합 가교가 형성됨으로써 이량체가 이루어지며, 또한 이 연장사슬(Ext)에는 이황화결합 가교로 이량체를 이루게 하는 사슬내짝이 없는 시스테인중의 마지막 시스테인과 이종작용기(F) 사이의 유연한 아미노산 서열(Flx)이 포함되며, 이 유연사슬(Flx)은 벌키(bulky)하지 않은 아미노산인 GASQEND(글리신, 알라닌, 세린, 글루타민, 글루탐산, 아르파라긴, 아스파르트산)을 포함하는 유연한(flexible) 아미노산 서열로 이루어져 있고;

F는 효소, 독소작용기단백질, 바이러스 등의 생체, 화합물, 약물작용을 위한 약물화합물, 라이포좀, 바이오센서, 프로드리그 등과 같은 작용기(F)를 나타낸다.

보다 특정한 양태로서, 본 발명의 2배 접착성 키메라 재조합 접착도메인(B)-작용기(F)융합체는 이량체로서 하기와 같이 표시할 수 있다:

[참고도 2]



- > 상기식에서, V_L 은 단일클론 항체의 경쇄의 가변영역을 나타내고;
- > C_L 은 단일클론 항체의 경쇄의 고정영역을 나타내고;
- > V_H 는 단일클론 항체의 중쇄의 가변영역을 나타내고;
- > C_H 는 단일클론 항체의 중쇄의 고정영역을 나타내고;
- > A는 아미노산 알라닌을 나타내고;

C는 아미노산 시스테인을 나타내고;

E는 아미노산 글루탐산을 나타내고;

G는 아미노산 글리신을 나타내고;

I는 아미노산 아이소루신을 나타내고;

K는 아미노산 라이신을 나타내고;

P는 아미노산 프롤린을 나타내고;

Q는 아미노산 글루타민을 나타내고;

S는 아미노산 세린을 나타내고;

T는 아미노산 트레오닌을 나타내고;

n은 1 또는 2 또는 3을 나타내고;

PE38은 녹농균 외독소의 도메인 I 및 도메인 II에서 세포 살상에 불필요한 부분의 아미노산이 제거된 38kDa의 녹농균 외독소 유도체를 나타낸다.

본 발명자들은 기존에 제작되어진 여러 재조합 접착도메인(B)-작용기(F) 융합체의 특징을 바탕으로 단일균 항체 B3을 모델 항체로 이용하여 2배의 접착성을 가짐으로서 친화도가 증가한 2배 접착성의 [B3(Fab)-(S/A)KPCI(S/A)T(K/Q)AS(G4S)_nGGPE-독소작용기]2 분자를 제작하였다.

그 동안 만들어졌던 대부분의 항체-독소작용기 융합체들이 1가 접착성(monovalent)임을 주지한다면 이량체인 2가 접착성(divalent) 항체-독소작용기 융합체는 월등히 높은 차원의 배양암세포 살상효과를 기대할 수 있다. 이 분자는 Fab-CKPSISTKASGGPE-독소작용기 형태의 1가 접착성 단량체를 구성하는데 필요한 펩타이드 사슬인 Fd-CKPSISTKASGGPE-독소작용기 사슬과 L 사슬 중 Fd-CKPSISTKASGGPE-독소작용기 사슬을 변형하여 만들어진 것이다. 변형된 사슬은 사슬내쪽이

없는 시스테인 위치를 시스테인 다음에 오는 세린의 위치로 바꾸고 원래의 사슬내짜이 없는 시스테인의 위치에 세린을 넣었다. (S/A)는 세린 또는 알라닌을, (K/Q)는 라이신 또는 글루타민을 나타낸다. 펩타이드 사슬인 $(G4S)_n$ (=GGGC 또는 GGGSGGGGS 또는 GGGGSGGGGGSGGGGS)를 나타내고 KASGGPE 안에 있어 $Fd-(S/A)KPCI(S/A)T(K/Q)AS(G4S)_nGGPE-PE38$ 모양의 구조를 갖고 있으며, 이것과 L 사슬을 섞어서 재접합과정을 통하여 활성이 있는 분자를 얻어낸다. 2배의 접착성인 이량체의 형성은 $Fd-(S/A)KPCI(S/A)T(K/Q)AS(G4S)_nGGPE-PE38$ 구조의 4번째 아미노산인 사슬내짜이 없는 시스테인에 의해 두 분자의 $Fab-(S/A)KPCI(S/A)T(K/Q)AS(G4S)_nGGPE-PE38$ 사이에 이황화결합 가교가 만들어짐으로써 $[Fab-(S/A)KPCI(S/A)T(K/Q)AS(G4S)_nGGPE-PE38]_2$ 의 형태로 이루어진다. 이 분자는 Fab -독소작용기형태의 장점인 분자구조의 안정성과 표적에 대한 작용 효과를 그대로 유지한다.

본 발명의 접착도메인(B)과 이종의 작용기서열(F)의 융합에 의해 만들어진 단량체인 키메라 재조합 접착도메인(B)-이종작용기(F) 융합체([접착도메인(B)-이종작용기(F) 융합체])를 이황화 결합 가교로 연결시켜 제작한 이량체인 2배 접착성 키메라 재조합 접착도메인(B)-이종작용기(F) 융합체 ([접착도메인(B)-이종작용기(F) 융합체]2)는, 접착도메인(B) 끝으로부터 연장되어 이종작용기(F)로 이어지는 연장 아미노산 서열(Ext)이 접착도메인(B)과 작용기(F)를 융합시키며, 이 연장사슬(Ext)에는 사슬내짜이 없는 시스테인의 산화에 의해 이황화결합 가교가 형성됨으로써 이량체가 이루어지며, 또한 이 연장사슬(Ext)에는 이황화결합 가교로 이량체를 이루게 하는 사슬내짜이 없는 시스테인중의 마지막 시스테인과 이종작용기(F) 사이의 유연한 아미노산 서열(Fix)이 포함되며, 이 유연사슬(Fix)은 벌키(bulky)하지 않은 아미노산인 GASQEND(글리신, 알라닌, 세린, 글루타민, 글루탐산, 아르파라진, 아스파르트산)을 포함하는 유연한(flexible) 아미노산 서열로 이루

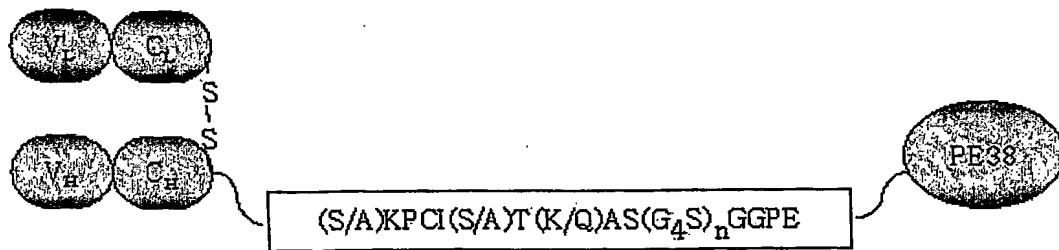
어져, 단량체인 키메라 재조합 접착도메인(B)-작용기(F) 융합체가 이량체를 이룰 때 작용기 사이의 입체적 방해를 감소시켜 2배 접착성 이량체를 형성하는 것을 특징으로 하는 이량체를 생성하는데 사용되는 폴리펩타이드를 코딩하는 유전자를 포함한 재조합 플라스미드를 포함한 숙주 세포를 배양하여 이량체를 형성하는데 필요한 폴리펩타이드들을 생성하고, 상기 생성된 폴리펩타이드들을 혼합하여 재접합시켜 제조한다.

이하에서, 본 발명에 따른 2배 접착성 키메라 재조합 접착도메인(B)-작용기(F) 융합체는 특정한 실시예를 통해 자세히 설명될 것이며, 이러한 설명을 기초로 하여 다른 모든 종류의 2배 접착성 키메라 재조합 접착도메인(B)-작용기(F) 융합체를 제조하는 것은 당업자에게 있어서 자명한 것이다.

> 본 발명의 다른 양태로서, 본 발명은 하기와 같이 표시되고 상기한 본 발명의 2배 접착성 재조합 항체-독소작용기 융합체를 제조하기 위한 폴리펩타이드를 제공한다:

> [참고도 3]

>



> 본 발명의 또 다른 양태로서, 본 발명은 상기 폴리펩타이드를 발현하는 재조합 플라스미드를 제공한다.

본 발명의 또 다른 양태로서, 본 발명은 상기 폴리펩타이드를 발현하는 재조합 플라스미드를 포함한 숙주 세포와 단일클론 항체의 경쇄의 가변영역(VL)과 경쇄의 고정영역(CL)의 결합체인 경쇄를 발현하는 플라스미드를 포함한 숙주 세포를 배양하여 상기 폴리펩타이드 및 단일클론 항체의 경쇄 부분 결합체를 생성하고, 상기 폴리펩타이드와 결합체를 혼합하여 재접합시키는 단계를 포함하여, 상기한 본 발명의 2배 접착성 재조합 항체-독소작용기 융합체를 제조하는 방법을 제공한다.

본 발명에 따른 상기 2배 접착성 재조합 항체-독소작용기 융합체는 암 치료를 위해 만들어진 재조합 항체-독소작용기 융합체로서 암세포에 특이적으로 접착하는 항체에 독소작용기를 연결하여, 암세포와 특이적으로 결합 후 정상세포에는 해를 주지 않으면서 암세포만을 살상한다.

- 본 발명의 명세서에서는 본 발명의 상기 2배 접착성 재조합 항체-독소작용기 융합체를 [B3(Fab)-Ext-PE38]2와 함께 병기하여 2배 접착성 재조합 항체-독소작용기 융합체 [B3(Fab)-Ext-PE38]2로 표기할 수 있다.
- > 본 발명의 2배 접착성 키메라 재조합 접착도메인(B)-작용기 융합체에 속하는 항체-독소작용기 융합체 [B3(Fab)-Ext-PE38]2는 항체의 Fab부위가 (S/A)KPCI(S/A)T(K/Q)AS(G4S)nGGPE로 독소작용기에 연결된 것으로 이량체를 형성하는데 필요한 사슬내짝이 없는 시스테인이 없어 단량체만을 형성하는 B3(Fab)-PE38로부터 유도된 형태이다. B3(Fab)-PE38은 단일 클론 항체 B3의 Fab 와 녹농균의 외독소(PE) 일부를 제거한 PE38을 융합시켜 제작한 것이다.
- > 본 발명에서 사용한 단일 클론 항체인 B3는 결장암, 위암, 난소암, 유방암, 폐암의 점액암종 뿐만 아니라 여러 가지 표피암종에서 발견되는 LeY 계열의 탄수화물 항원에 직접적으로 결합한다.

본 발명에서 독소작용기부분은 녹농균 외독소(PE)의 유도체인 PE38을 사용하였다. PE는 3개의 구조적 도메인으로 구성되어 있다. 아미노 말단의 세포와 결합하는 도메인 I, 세포 내로 이동을 가능하게 하는 두 번째 도메인II, 세포살상 활성을 가진 카르복실 말단 도메인III로 이루어져 있다. 첫 번째 도메인 전체와 두 번째 도메인중 세포 살상에 불필요한 부분의 아미노산을 제거하여 38kDa의 PE38을 제작하였다.

본 발명에 사용된 단일 클론 항체 B3은 천연의 상태에서는 경첩에 존재하는 3개의 시스테인에 의해 [Fab-Fc]가 [Fab-Fc]2 이량체를 이룬 상태로 얻어진다. 본 발명에서는 1개의 사슬내짝이 없는 시스테인을 사용하거나 또는 재접힘과정에서 이황화결합 섞임의 가능성에도 불구하고 과감히 3개의 사슬내짝이 없는 시스테인을 사용함으로서 복수의 사슬내짝이 없는 시스테인을 사용하여도 활성이 있는 이량체를 생성할 수 있음을 보였다. 당업자들은 복수의 사슬내짝이 없는 시스테인에 의한 복수의 이황화결합 가교에 의해 형성된 이량체가 열역학적으로 매우 안정한 이량체를 이를 것임을 알 수 있다.

본 발명에 사용되는 연장사슬 (S/A)KPCI(S/A)T(K/Q)AS(G4S)nGGPE는 GASQEND를 포함하는 유연한 사슬 I(S/A)T(K/Q)AS(G4S)nGGPE를 갖고 있으며, 또한 이에 존재하는 사슬내짝이 없는 시스테인의 티올 기에 의한 이황화결합 가교를 통해 두 개의 폴리펩타이드 [B3(Fab)-Ext-PE38]로부터 본 발명의 2배 접착성 재조합 항체-독소작용기 융합체 [B3(Fab)-Ext-PE38]2를 형성하게 한다.

> 이러한 본 발명의 펩타이드 서열의 사슬내짝이 없는 시스테인 이후의 유연한 아미노산 서열 (F1x)은 두 개의 녹농균 외독소작용기 PE38사이에 입체적 방해를 감소시킴으로써 B3(Fab)-Ext-PE38의 이량체 형성을 용이하게 한다. 또한 같은 조건하에서 동시에 실시한 실험에서 n이 1에서 3으로 증가할 수록 생성 수득률이 증가함을 보였다. 이는 항체의 50 kd의 분자

량을 갖는 Fab 서열과 38 kd의 분자량을 갖는 경우에는 유연서열(F1x)이 갖는 GASQEND의 개수가 21개까지 늘어나는 동안 계속하여 이량체의 형성이 증가함을 뜻한다.

본 발명에서 밝힌 바에 의해 특정의 사슬내짝이 없는 시스테인의 위치와 개수 또한, 특정의 아미노산 서열만에 의해 이량체의 형성이 가능한 것이 아니고 복수의 시스테인 위치와 개수, 그리고 적절한 유연한 서열(F1x)에 의해서도 이량체가 생성될 수 있음을 습득하였다면, 접착도메인(B)과 작용기의 크기가 다른 경우에는 다른 경향성을 보일 것임을 당업자들은 쉽게 예측할 수 있을 것이다. 즉, 작은 크기의 접착도메인(B)과 작은 크기의 작용기 사이의 융합체의 경우에는 유연사슬(F1x)이 갖는 GASQEND의 개수가 1개일 때도 이량체가 생성될 수 있을 것이며, 유연사슬의 GASQEND의 개수가 너무 많을 경우에는 오히려 접착도메인(B)과 작용기 사이의 자유로운 상호작용에 의해 활성을 소멸시키는 경우가 있을 수 있음을 당업자들은 쉽게 예측할 것이다. 그러나 거대한 크기의 접착도메인(B)과 거대한 크기의 작용기 사이의 유연사슬의 경우에는 유연한 아미노산 GASQEND가 1개만 존재하는 경우에는 활성이 있는 분자를 얻을 가능성은 없을 것이고 보다 많은 수가 필요함을 당업자들은 쉽게 예측할 수 있을 것이다.

- > 본 발명에 따른 2배 접착성 재조합 항체-독소작용기 융합체의 이량체 [B3(Fab)-Ext-PE38]2는 항체를 생산하는 유전자와 독소작용기를 생산하는 유전자를 융합시킨 후 대장균에서 발현시키는 방식을 응용하여 제조한다 [참조: Allured et al., 1986; Brinkmann et al., 1992; Pai et al., 1991; Roscoe et al., 1997].
- > 자세하게는, 본 발명에서 폴리펩타이드 B3(Fd)-Ext-PE38를 발현하는 재조합

플라스미드를 제조한다. 여기서, 폴리펩타이드 B3(Fd)-Ext-PE38은 B3(Fd)-PE38의 Fd와 PE38 사이에 (S/A)KPCI(S/A)T(K/Q)AS(G4S)nGGPE의 펩타이드 사슬을 갖고 있다. 따라서, 이 경우의 연장사슬(Ext)의 아미노산 서열은 "I(S/A)T(K/Q)AS(G4S)nGGPE"에 해당하며, B3(Fd)-Ext-PE38의 구성은 B3(VH)-B3(CH1)-I(S/A)T(K/Q)AS(G4S)nGGPE-PE38과 같다. 연장사슬(Ext)에 존재하는 사슬내짜이 없는 시스테인이 두개의 Fab-Ext-PE38 사이에 이황화결합 가교를 형성한다. 연장사슬에 포함되어 있는 사슬내짜이 없는 시스테인 이후의 유연한 아미노산 서열(F1x)에 의해 두개의 PE38사이에 이량체 형성시의 입체적 방해가 감소됨으로써 B3(Fab)-Ext-PE38의 이량체 형성이 용이하게 일어난다.

연장서열은 단백질의 3차 구조 형성에 있어서 재조합 단백질인 항체-독소작용기 융합체에서 항체단백질 부분과 PE 독소작용기사이의 접힘이 서로 방해하지 않고 독립적으로 일어나도록 하는 기능을 가져야 하는 것으로 해석되고 있다.

- > 본 발명에서, 연장사슬에 있는(S/A)KPCI(S/A)T(K/Q)AS(G4S)nGGPE 중 끝에 있는 P(프롤린)은 항체 조각과 독소작용기 조각이 단백질 재접힘과정을 거치면서 각각의 재접힘 모티브가 이웃한 부위의 재접힘에 영향을 주지 못하도록 모티브의 연속성을 끊는 기능을 한다.
- > B3(Fd)-Ext-PE38를 발현하는 본 발명의 재조합 플라스미드를 포함한 숙주 세포와 단일클론 항체 B3의 경쇄의 가변영역(VL)과 경쇄의 고정영역(CL)의 결합체인 경쇄를 발현하는 플라스미드를 포함한 숙주 세포를 배양한 후 상기 폴리펩타이드 B3(Fd)-Ext-PE38 및 단일클론 항체 B3의 경쇄 부분을 생성하고, 폴리펩타이드 B3(Fd)-Ext-PE38와 경쇄 부분을 혼합하여 재접힘 과정을 통해 본 발명의 2배 접착성 재조합 항체-독소작용기 융합체를 제조한다. 제작된 유전자는 대장균(E.coli)에서 발현시켜 봉입체(inclusion body)의 형태로 얻는다. 봉입체로 얻어진 폴리펩타이드는 재접힘 과정을 거치고 만들어진 생성물 중에서 활성을 가진 것만을 분리해낸다.

재접합 과정은 본 분야의 통상적인 방법을 이용할 수 있으며 예를 들면 문헌 [참조: Buchner, J., et al., *Anal. Biochem.* 205(2), 263-70 (1992)] 및 문헌 [참조: Buchner, J., et al., *Biotechnology*, 9: 157-162 (1991)]에 기술된 방법을 들 수 있다.

본 발명에 따른 2배 접착성 재조합 항체-독소작용기 융합체 [B3(Fab)-Ext-PE38]2의 ID50 값은 A431 상피암 세포주에서 4ng/ml, CRL1739 위암 세포주에서 1ng/ml, MCF-7 유방암 세포주에서 5ng/ml으로 측정되었다. 2배 접착성 재조합 항체-독소작용기 융합체 [B3(Fab)-Ext-PE38]2가 1가 접착성의 항체-독소작용기 융합체인 B3(scFv)-PE40에 비하여 CRL1739 세포주에서 약 12배 정도의 높은 세포 살상력을 갖고 있음을 보여주었다.

본 발명에 의한 2배 접착성 재조합 접착도메인(B)-이종작용기 융합체는 담체 또는 희석제 등 약제학적으로 허용되는 부형제를 함께 포함하는 약제학적 항암 조성물을 제공한다. 본 발명의 2배 접착성 재조합 접착도메인(B)-이종작용기 융합체를 함유하는 약제학적 조성물은 통상적인 방법에 따라 제조하고 약제학적으로 적합한 형태로 투여한다.

- › 본 발명에 따른 2배 접착성 재조합 접착도메인(B)-이종작용기 융합체는 단독으로 또는 방사선 요법 또는 화학 요법(세포성장정지 또는 세포독성 물질, 항생물질형 물질, 알킬화제, 항대사성 물질, 호르몬제, 면역제, 인터페론형 물질, 사이클로옥시게나제 억제제(예, COX-2 억제제), 메탈로매트릭스프로테아제 억제제, 테로미라제 억제제, 티로신 키나제 억제제, 항성장인자수용체 물질, 항-HER 물질, 항-EGFR 물질, 항-헬관생성 물질, 파르네실 트랜스퍼라제 억제제, ras-raf 시그널 전도 경로 억제제, 세포 주기 억제제, 기타 cdk 억제제, 튜뷸린 결합제, 토포이소미라제 I 억제제, 토포이소미라제 II 억제제 등)과 같은 다른 화학요법 치료와 병용하여 투여할 수 있다.

예를 들면, 본 발명의 2배 접착성 재조합 접착도메인(B)-이종작용기 융합체는 리포좀 제제내에 임의로 함유된 하나 이상의 화학요법제(예, 택산, 택산 유도체, 캡슐화 택산, CPT-11, 캠프토테신 유도체, 안트라사이클린 글리코사이드, 예를 들면 독소작용기루비신, 이다루비신, 에피루비신, 에토포사이드, 나벨바인, 빈블라스틴, 카르보플라틴, 시스플라틴, 에스트라무스틴, 셀레록시브, 슈겐 SU-5416, 슈겐 SU-6668, 헤르셉틴 등)와 병용하여 투여될 수 있다.

일정한 용량으로 제형되는 경우, 이러한 조합물은 본 발명의 본 발명에 따른 2배 접착성 재조합 접착도메인(B)-이종작용기 융합체를 하기하는 용량 범위내에서 사용하고 다른 약제학적으로 활성 물질은 승인된 용량 범위내에서 사용한다.

본 발명의 2배 접착성 재조합 접착도메인(B)-이종작용기 융합체는 조합 제제가 부적절할 경우 알려진 약제와 순차적으로 사용할 수 있다.

본 발명에 따른 2배 접착성 재조합 접착도메인(B)-이종작용기 융합체는 통상의 경로로 투여할 수 있으며 용량 수준은 환자의 연령, 체중, 상태 및 투여 경로에 의해 결정된다. 예를 들면, 본 발명에 따른 2배 접착성 재조합 접착도메인(B)-이종작용기 융합체를 경구 투여하기에 적합한 용량은 일일 1 내지 5회로 용량당 약 10 내지 약 500 mg의 범위일 수 있다. 본 발명에 따른 2배 접착성 재조합 접착도메인(B)-이종작용기 융합체는 여러 용량형, 예를 들면 정제, 캡슐, 당의정 또는 필름 피막 정제, 액제 또는 혼탁제의 경구 형태, 좌제의 직장 투여 형태, 근육내, 정맥내 및/또는 척수강내 및/또는 척수내 주사 또는 주입의 비경구 형태로 투여할 수 있다.

▷ 경구용 고형제는 활성 화합물과 함께 희석제(예, 락토즈, 텍스트로즈, 자당, 셀룰로즈, 옥수수 전분 또는 감자 전분), 활택제(예, 실리카, 탈크, 스테아린산, 마그네슘 또는 칼슘 스테아레이트 및/또는 폴리에틸렌 글리콜), 결합제(예, 전분, 아라빅 검, 젤라틴 메틸셀룰로즈, 카르복시메틸셀룰로즈 또는 폴리비닐 피롤리돈), 봉해제(예, 전분, 알긴산, 알기네이트 또는 나트

롭 전분 글리콜레이트), 포르말 혼합물, 염료, 감미제, 습윤제(예, 레시틴, 폴리솔베이트, 라우릴설페이트) 및 일반적으로 약제에 사용되는 약물학적 불활성 물질을 함유할 수 있다. 이들 약제는 공지된 방법, 예를 들면 혼합, 과립화, 타정, 당의 또는 필름-피복 공정의 수단에 의해 제조할 수 있다.

경구 투여용 액체 분산액은 예를 들면 시럽, 유화액 및 혼탁액일 수 있다. 혼탁액 및 유화액은 담체로서 예를 들면 천연 검, 한천, 나트륨 알기네이트, 페틴, 메틸셀룰로즈, 카르복시메틸셀룰로즈 또는 폴리비닐 알코올을 함유할 수 있다. 근육내 주사를 위한 혼탁액 또는 용액은 활성 화합물과 함께 약제학적으로 허용되는 담체, 예를 들면 멸균수, 올리브유, 에틸올레이트, 글리콜(예, 프로필렌 글리콜) 및 필요한 경우 적합한 양의 리도카인 하이드로클로라이드를 함유할 수 있다. 정맥내 주사 또는 주입용 용액은 담체로서 예를 들면 멸균수를 함유하거나 바람직하게는 멸균, 수성, 등장성 염수 용액의 형태일 수 있거나 담체 프로필렌 글리콜을 함유할 수 있다. 좌제는 본 발명에 따른 2배 접착성 재조합 접착도메인(B)-이종작용기 융합체와 함께 약제학적으로 허용되는 담체, 예를 들면 코코아 버터, 폴리에틸렌 글리콜, 폴리옥시에틸렌 솔비탄 지방산 에스테르 계면활성제 또는 레시틴을 함유할 수 있다.

> 이하, 본 발명을 실시예를 통하여 보다 구체적으로 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 단지 본 발명의 한 태양에 불과하며 본 발명의 권리범위를 한정하는 것이 아니다.

> <실시예 1>

> 연장서열(Ext)의 4번 위치에 사슬내짝이 없는 시스테인을 고정하고 유연사슬(Flex)의 길이와 유연한 아미노산의 개수를 5개씩 증가시켜 만들어진 분자들의 이량체 형성

[B3(Fab)-Ext(4CF5X)-toxin]₂는 Fab-toxin의 이량체 형성을 위해 Fab 와 toxin domain 사이에 연장펩타이드 사슬을 삽입하고 유연사슬에 유연한 아미노산을 11개, 16개, 21개로 5개씩 증가시키고 이황화결합을 할 수 있는 사슬내짝이 없는 시스테인기를 연장사슬의 4번 위치에 고정한 형태이다.

본 실시예에서는 B3 항체의 Fab 부위 뒤에서 시작되는 연장사슬의 4번째 아미노산 위치에 사슬내짝이 없는 시스테인기를 고정해서 넣어 중합체 형성을 유도하고, 이 고정된 사슬내짝이 없는 시스테인과 함께 Fd와 toxin domain 사이의 연장펩타이드 사슬이 포함하는 유연사슬에 서로 다른 개수의 유연한 아미노산을 넣어 이에 의한 입체 공간의 여유가 다름으로 인해 일어나는 수득율의 증감을 비교하고자 하였다. 사용한 유연 아미노산의 개수는 11개, 16개, 21개의 아미노산으로 달리하였다. 또한 연장사슬이 포함하고 있는 hinge로부터 유래된 서열중 이황화 결합의 뒤섞임을 우려하여 사슬내짝이 없는 시스테인의 숫자를 줄이기 위해 시스테인을 대신하여 치환해 넣어준 아미노산으로 알라닌을 사용하여 종류의 세린을 사용하였을 경우의 세린의 -OH 그룹에 의한 입체공간의 점유를 없애고 이로 인한 이량체의 형성의 변화를 관찰하였다.

> 본 실시예에서 제시하는 4가지의 [B3(Fab)-Ext(4CF5X)-PE38]₂ 분자들은 단량체 사이의 이황화 결합을 고정된 같은 사슬내짝이 없는 시스테인으로 하게 하여 이웃한 항체와 독소작용기에 대한 이황화결합 뒤섞임과 입체구조형성에 대한 방해의 정도를 모두 같게 고정하고 사슬내짝이 없는 시스테인 이후의 서열에서는 다른 아미노산은 모두 같게 사용하면서 유연한 아미노산의 개수만을 증가시켜 유연사슬이 주는 입체공간의 여유를 같은 조건 하에서 증가시켰다. 이 분자들은 이제까지 만들어진 분자들의 수득율에 비해 수득율이 12-17배로 유연한 아미노산의 개수의 증가에 따라 수득율이 증가함을 보여주었다.

따라서 본 실시예는 50 kd 의 거대 분자량을 갖는 B3 항체의 Fab 도메인과 38 kd 의 거대 분자량을 갖는 독소작용기사이의 융합체에서, 연장사슬에 있는 사슬내짝이 없는 시스테인에 의한 단량체간의 이황화결합의 형성은 이제까지 만들어진 분자들에 대한 결과를 기초로 하여 본 실험에서 사슬내짝이 없는 시스테인이 어느 특정한 연장사슬의 위치에 있어야만 거대 부위와 상호방해가 없이 이량체가 형성되는 것이 아니고 어느 일정한 범위에서는 어디에 있던지 이량체의 형성을 가능케 한다는 사슬내짝이 없는 시스테인의 위치에 대한 일반적인 선택이 가능함을 본 실험이 결정적으로 보여주고 있고, 유연한 아미노산의 개수는 위의 11~21개 범위에서 개수가 증가할수록 이량체의 형성에 도움을 준다는 것을 보여주고 있다.

(재료 및 방법)

Protein expression system으로는 *E. coli* BL21(λDE3)를 사용하였다. Cytotoxicity test에 사용한 Cancer Cell Line은 A431, CRL1739, MCF7, KB3-1이다. pMH21, 22, 23, pMHS22은 B3(Fd)-Ext(4CF5X)-PE38을 coding 하는 plasmid이고, construction에 사용한 plasmid는 pMC74와 pCE2이며, light chain을 coding하며 pMH21, 22, 23, pMHS22와 짝을 이루는 light chain을 제공하는 plasmid로는 pMCH75을 사용했다. 실험에 사용한 plasmid와 cell line, primer에 대한 설명은 표1, 표2, 표3에 각각 나타내었다.

>

【표 1】

Name	Coding Proteins
pMC74	B3(Fd)-SKPCISTKASGGPE-PE38REDLK
pCE2	B3(Fd)-SKPCISTKASG4C(G4S)2 GGPE- PE38REDLK
pMCH75	H6-B3(L)
pMH21	B3(Fd)-Ext(4CF11)-PE38 =B3(Fd)-SKPCISTKAS(G4S)1 GGPE- PE38REDLK
pMH22	B3(Fd)-Ext(4CF16)-PE38 =B3(Fd)-SKPCISTKAS(G4S)2 GGPE- PE38REDLK
pMH23	B3(Fd)-Ext(4CF21)-PE38 =B3(Fd)-SKPCISTKAS(G4S)3 GGPE- PE38REDLK
pMHS22	B3(Fd)-Ext(AQ4CF16)-PE38 =B3(Fd)-A KPCIA TQ AS(G4S)2 GGPE- PE38REDLK

【표 2】

cell line	cell type	B3 antigen expression	Used Media
A431	Epidermoid	+++	RPMI 1640, 10% FBS
CRL-1739	Gastric	+	RPMI 1640, 10% FBS
MCR-7	Breast adenocarcinoma	+++	RPMI 1640, 5% FBS
KB3-1	Epidermoid cervix	-	DMEM, 5% FBS

【표 3】

Name of the primer	Sequence 5'-3'
Primer MH-1	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA GA
Primer MH-2	AGA TCC GCC ACC ACC AGA AGC TTT TGT ACT TAT GCT
Primer MH-3	CCA GAT CCG CCA CCA CCA CTT CCC CCT CCC CCG GAA GCT TTT GTA CTT ATG CTA GGC TTA CT
Primer MH-4	TGC TGG TGG CGG ATC TGG AGG TCC CGA GGG CGG CAAG C
Primer MH-5	TGG TGG TGG CGG ATC TGG AGG TGG CGG AAG CGG AGG TCC CGA GGG CGG CAG C
Primer MH-6	GCC GCG GGT GCT GAA GCT GAC GTC GCC GCC GTC
Primer MH-7	GGG AAT TCA TTA AGC TTG TGT AGC TAT GCA AGG CTT AGC ACC ACA

> Bacterial culture시 사용한 배지로는 tryptone, yeast extract, agar는 Difco사, 기타 무기 염류는 Junsei사의 제품을 사용하였다. 균주 선별을 위한 항생물질은 ampicillin(Sigma chemical co.)을 최종 농도가 200 μ g/ml이 되도록 배지에 첨가하여 사용하였다.

Plasmid construction에 사용한 제한효소인 *Nde*I, *Hind*III, *Sa*II은 NEB사 제품을 사용하였다. PCR amplification에서의 Ex *Taq* polymerase와 ligation에서의 T4 DNA ligase는 TaKaRa사 제품을 사용하였다. 단백질 정량은 Pierce사의 Coomassie Plus Protein Assay Reagent와 BSA standard protein을 이용하였다. Dialysis, denaturation, refolding, protein purification 등에 사용한 buffer 제조에는 Sigma사의 제품을 사용하였다. Protein induction시 사용한 isopropyl- β -thiogalactopyranoside(IPTG)와 dialysis시의 urea는 Duchefa사 제품을 사용하였다.

단백질 분리정제에 사용된 column은 anion exchange chromatography로 Q-sepharose(Pharmacia Biotech)와 Source Q(Pharmacia Biotech)를 사용하였고 size exclusion chromatography는 Superdex-200(Pharmacia Biotech)을 사용하였다.

- › (Plasmids 제작)
- › B3(Fd)-Ext-PE38 재조합 단백질을 발현하는 plasmid의 제작은 pMC74(Fd-PE38)를 template로 하여 splicing PCR을 통해 Fd와 PE38사이에 존재하는 KASGGPE 사이에 (G4S)_n 이 삽입된 서열을 만들었다. 이렇게 만들어진 (G4S)_n 이 삽입된 서열은 vector plasmid인 pCE2 (B3(Fd)-SKPCISTKASGGPE-PE38을 발현하는 벡터)에 Hind III와 EcoRI을 사용하여 해당하는 부분과 교체하였다.
- › 또한 경첩 부위의 시스테인을 알라닌으로 변형시킨 pMHS22 (B3(Fd)- Ext(AQ4CF16)-PE38)는 pMH22 (B3(Fd)-Ext(4CF16)-PE38)를 template로 해서 PCR을 이용해 fragment를 얻은 후 pMH22의 해당부위와 교체하여 만들었다.

[B3(Fd)-Ext(4CF11,16,21)-PE38]₂를 발현시키는 pMH21, pMH22, pMH23와 B3(Fd)-Ext(AQ4CF16)-PE38 (hinge 부분의 시스테인자리에 알라닌을 넣은 plasmid)를 발현시키는 pMHS22의 구조는 도 1에 나타내었다. Plasmid의 제작과정은 도 2에 나타내었고,

(단백질 발현과 inclusion body 분리)

사용하는 단백질 사슬은 각기 플라스미드 pMH21, pMH22, pMH23, pMHS22, pMCH75에 의해 만들 어지며, *E. coli* BL21(λDE3)에서 발현시켰다 (Studier *et al.*, 1986). 박테리아는 superbroth (Tryptone 10g, Yeast extract 5g, Sodium chloride 10g)에 0.05% MgSO₄, 2% Glucose, Ampicilin 150μg/ml per liter를 첨가한 배양액 속에서 37°C로 키웠다. OD600 1.5-2.0사이에서 최종농도 1mM이 되도록 IPTG를 넣어 induction시킨 후 OD600 3정도 될 때까지 3시간 더 배양하였다. Cell들을 3500rpm, 4°C에서 20분간 원심분리 하여 침전 형태로 모은 후, 200ml ice-chilled sucrose용액으로 resuspension한 후 8000g, 4°C에서 20분간 원심분리 하여 침전 형태를 얻었다. 다시 ice-chilled water 200ml로 빠르게 resuspension하여 osmotic shock를 준 후, 15000g, 4°C에서 20분간 원심분리 하여 outer membrane^o 제거된 spheroplast pellet을 얻었다. 이 침전은 TE buffer(50mM Tris-CI pH8.0, 20mM EDTA pH8.0)로 resuspension 하고, Lysozyme처리를 하여 inner membrane을 제거한다. 고농도 염인 5M NaCl과 25%Triton X-100을 첨가해 tissuemizer로 고르게 섞어 1시간 정도 incubation한 후 25000g, 30분간 원심분리 하여 침전형태의 inclusion body를 얻는다. Periplasmic protein의 제거를 위해, 25%Triton X-100을 첨가해 tissuemizer로 고르게 섞는 과정을 1회 반복하여 25000g, 30분간 원심분리 한 후, 4M urea buffer(4M urea, 0.1M Tris-CI)로 washing 한 후, TE buffer(50mM Tris-CI pH7.4, 20mM EDTA pH7.4)로 resuspension하여 25000g, RT에서 30분간 원심분리 하는 과정을 3번 반복

한다. 얻어진 inclusion body는 Coomassie Plus Protein Assay reagent를 통해서 전체 단백질의 양을 정량하고, Tina 2.0프로그램을 이용해 항체독소 단백질만의 양을 계산한다. 또한 refolding 과정에 들어가기 전까지 -70°C에 보관한다.

(재접힘 과정과 단백질 분리과정)

각각의 Inclusion body를 용해완충용액(6M Guanidine-HCl, 0.1M Tris-CI, pH8.0, 2mM EDTA pH8.0)에 녹인 후, 항체독소 단백질이 40mg 이 되고 최종 부피가 5ml이 되도록 용해완충용액을 사용하여 B3(Fd)-ext-PE38 과 B3(L)을 1:1 몰 비로 섞어준다. 혼합물에 0.06mM Dithiotreitol(DTT)을 넣어 2시간 가량 환원과정을 거친다. 재접힘과정은 500ml 재접힘 완충용액(0.1M Tris-CI, pH8.0, 0.5M L-Arginine-HCl, 1.6 mM oxidized Glutathione, 2mM EDTA)에 5ml을 넣어 1:100으로 급속히 희석 시켜 48시간동안 10°C에서 진행하였다. refolding 과정에 사용된 항체독소 단백질의 양은 총 80mg이며 refolding 완충용액은 1L사용하였다. refolded 단백질은 dialysis를 거친 후 Q-sepharose, source Q, Superdex200 컬럼을 통해서 분리해낸다 (Choe *et al.*, 1994).

> (세포살상 효과분석)

> 분리된 $[B3(Fab)-Ext-PE38]_2$ 세포 살상력은 다음과 같이 측정하였다. LeY 항원을 발현하는 세포주인 A431, CRL1739, MCF-7 세포주와 항원을 발현하지 않는 대조구인 KB3-1을 1×10^5 cells/ml이 되도록 희석하여 96-well plate에 $180\mu\text{l}$ 씩 분주하고, 24시간동안 37°C CO_2 incubator에서 배양하였다. 정체한 항체독소 분자들은 10000ng/ml, 1000ng/ml, 100ng/ml,

10ng/ml, 1ng/ml, 0.1ng/ml, 0.01ng/ml이 되도록 0.2% BSA가 포함된 PBS에 연속 희석한다. 희석된 항체독소는 각각 3개의 well에 20 μ l 씩 분주하고 24시간동안 배양하였다.

[³H]-leucine(NEN)을 한 well당 1Ci 가 되도록 넣고 14시간 배양한 후 -70°C에 두어 세포를 얼렸다가 녹인 후, 1450 Microbeta TriLux Liquid Scintillation Counter(Wallac EG&G.co.)를 이용해서 살아있는 세포내의 [³H]양을 측정하였다. 사용된 4가지 세포들은 표 2에 나타내었다.

(발현벡터의 제작과 Inclusion body 분리)

PCR을 통해 만들어진 pMH21, pMH22, pMH23, pMHS22의 염기 서열은 서열 분석을 통하여 확인하였다.

T7 polymerase의 단백질 대량생산 방법을 통해 얻은 inclusion body 형태의 각 단백질은 Fd-Ext-toxin을 포함한 단백질이 80-100mg/L, light chain을 포함한 단백질이 100-120mg/L로 얻어졌다. Cell 전체 protein 중 antibody-toxin만을 순수분리 하기 위해 우선 osmotic shock을 주어 outer membrane을 없애는 과정으로 periplasmic protein을 제거하였고 25% Triton X-100, 5M NaCl로 washing 하는 과정을 1회, 25% Triton X-100으로 washing 하는 과정을 1회, 4M urea(4M urea, 0.1M Tris-C1)로 washing 하는 과정을 1회 반복한 후 TE buffer로 섞어 준 후 washing 하여 원심 분리하는 과정을 3회 반복함으로써 inclusion body 이외의 protein들을 제거하였다. PAGE gel 상에서 실제 antibody-toxin이 차지하는 비율을 densitometry 분석(TINA 2.0)해 본 결과 Fd-Ext-toxin와 light chain은 약 30% 정도였다.

([B3(Fab)-Ext(4CF5X)-PE38]₂분자의 refolding)

각각의 inclusion body, B3(Fd)-ext-PE38 과 B3(L), 를 1:1 를 비로 넣어 refolding 과정을 실시하였다. 선행 실험에서 제작된 [Fab-toxin]₂ 형태의 항체독소는 Ext의 첫 번째 위치에 사슬내짝이 없는 시스테인을 넣어 이황화결합을 유도한 형태였는데 (pCE1의 분자) refolding 후 매우 낮은 생산량을 보였다(Choi *et al.*, 2001). 이렇게 낮은 생산량은 사슬내짝이 없는 시스테인의 위치가 Fab 부위에 너무 가까워 Fab서열 내의 시스테인과 뒤섞임이 일어날 가능성이 크며, Ext사슬에 포함된 유연한 아미노산의 개수가 적은 숫자이어서 2개의 거대한PE간에 발생하는 입체적 장애를 극복하지 못한 것 때문으로 해석하여, 이 문제를 해결하기 위하여 사슬내짝이 없는 시스테인의 위치를 Ext사슬의 15번째 위치로 Fab 부위에서 멀리 떨어지게 하고 F1x사슬의 유연한 아미노산의 숫자도 13개로 늘려 뒤에 오는 PE의 공간에서의 회전자유도와 입체적인 여유공간을 증가시켜 효과적인 재접힘을 이루어 이량체를 잘 형성할 수 있도록 사슬내짝이 없는 시스테인의 위치를 변경하고 유연성 있는 연장 펩타이드를 삽입하는 실험 (pCW1의 분자)이 실시되었다. 이때 이황화결합은 삽입해준 연장 펩타이드 내에서 이루어진다. 유연성 있는 연장 펩타이드를 삽입하여 주었을 때 [B3(Fab)-ext-PE38]₂의 생산량은 이전의 [B3(FabH1)-PE38]₂ 0.014%에서 0.06%로 증가하였다. 이는 이황화결합 짹이 사슬 내에 같이 존재하지 않는 상태의 시스테인을 접착서열 Fab로부터 15번째의 위치에 넣어도 접착서열 Fab나 작용기 PE38의 사슬내짝이 있는 시스테인과 뒤섞임이 크게 일어나지 않고 또한 입체적 구조 형성도 크게 방해하지 않고 있음으로 해석되며, F1x사슬의 유연한 아미노산의 개수가 늘어남으로서 작용기인 PE38사의 입체적 방해도 줄어 든 것으로 해석할 수 있다. 따라서 이번 실험에서는 선행의 실험에서 사슬내짝이 없는 시스테인을 넣었던 두 위치인 1번과 15번 위치의 중간위치인 4번째 위치에 시스테인을 넣어 사슬내짝이 없는 시스테인이 어느 특정위치에 있을 때만 접착서열 Fab와/또

는 작용기 PE38와의 특정한 호의적 상호작용에 의해 이량체형성을 허락하는 것이 아니고 여러 위치에서도 이량체의 형성을 가능하게 하는 사슬내짝이 없는 시스테인의 위치의 허용되는 위치가 일정한 범위 내에 있다는 것을 확인코자 하였다. 또한 이번 실험에서는 중간위치인 4번째 위치에 사슬내짝이 없는 시스테인을 고정하고 F1x사슬이 포함하는 유연한 아미노산의 개수를 5개 아미노산 단위로 증가시켜 선행 실험에서 얻어진 이량체 형성이 가능함을 관찰한 결과는 특정의 유연한 아미노산 개수와 서열에서만 이량체 형성이 가능한 것이 아니고 일정한 범위가 존재하고 그 안에서 이량체 형성 수득율이 변화할 것이라는 가정을 확인시켜 주었다.

이번 실험에서는 1) 11, 16, 21개의 유연한 아미노산이 연장 펩타이드(Ext)사슬의 F1x사슬에 있어 F1x사슬의 길이와 유연한 아미노산의 개수에 따른 [B3(Fab)-Ext(4CF5X)-PE38]2 생산량의 변화를 알아보고, 2) 연장 펩타이드 1번의 위치나 15번의 위치가 아닌 중간의 4번의 위치에 있는 사슬내짝이 없는 시스테인에 의한 이황화결합이 [B3(Fab)-Ext(4CF5X)-PE38]2 생산량에 어떠한 영향을 주는지 알아보려 하였다. 또 3) Ext사슬에 쓰인 항체의 경첩(hinge)서열로부터 유래한 SKPCISTK를 AKPCIATQ로 변형시켰을 때 [B3(Fab)-Ext(4CF5X)-PE38]2 생산량에 어떠한 영향을 주는지 알아보려 하였다.

> 1) 11, 16, 21개의 유연성 아미노산을 삽입하였을 때 [B3(Fab)-Ext(4CF5X)-PE38]2의 최대 생산량은 0.17%-0.25%로 나타났다. 이것은 [B3(FabH1)-PE38]2보다는 12.1-17.8배, [B3(Fab)-ext-PE38]2보다는 2.8-4.1배 증가한 것이다.

>

【표 4】

플라스미드 이름	이량체 수득률 (%)	Ext에서 Cys의 위치	Cys와 PE38간의 거리	연속된 Flexible A.A. (GASQEND)	Total Flexible A.A. (GASQEND)
pCE1	0.016	1	13	4	7
pCW1	0.06	15	14	12	13
pMH21	0.18	4	15	9	11
pMH22	0.23	4	20	14	16
pMH23	0.25	4	25	19	21
pMHS22	0.24	4	20	15	17

표 4에서 보듯이 이황화결합이 이루어지는 사슬내짝이 없는 시스테인에서부터 PE38 사이의 F1x 대하여 13개의 아미노산에서부터 25개의 아미노산으로 이루어진 F1x펩타이드에 대한 실시 예가 존재한다. 이중 13개의 아미노산의 펩타이드를 갖고 있는 [B3(FabH1)-PE38]2의 생산량은 0.014%로 거의 생산되지 않는 반면 13개와 별차이가 없는 14, 15개의 연장 펩타이드를 삽입하였을 때 이량체의 최대 생산량은 0.17-0.25%로 증가하였다. 이것은 이황화결합과 PE38사이에 비록 비슷한 펩타이드가 존재하더라도 PE38간에 발생하는 입체적 장애를 극복하는 데에는 유연성 아미노산을 포함하는 F1x펩타이드가 필요하다는 것을 나타낸다. 11, 16, 21개의 유연성 아미노산을 포함하는 F1x펩타이드를 삽입하였을 때 0.17에서 0.25로 조금씩 증가하는 생산량을 나타낸 것과 같이 PE38간에 발생하는 입체적 장애를 해소하기 위해서는 유연성 있는 F1x펩타이드가 필요하다는 것을 알 수 있다. 또 pMH23(B3(Fd)-Ext(4CF21)-PE38)에서와 같이 이황화결합에서 PE38사이에 25개의 펩타이드, 19개의 유연성 아미노산이 있는 F1x펩타이드가 존재하더라도 이 길이에 의해 작용기 PE38이 Fab. 재접힘이나 접착활성을 방해하여 활성이 있는 [B3(Fab)-Ext(4CF5X)-PE38]2형성에 영향을 주지 않음을 알 수 있다.

» 2) 이황화결합을 연장펩타이드의 15번 위치로 옮겼을 때 [B3(Fab)-ext-PE38]2의 생산량이 0.06%인데 비해, 이황화결합이 4번 위치인 [B3(Fab)-Ext(4CF5X)-PE38]2의 최대 생산량은

0.17-0.25%로 증가하였다. 이것은 연장 펩타이드 내에서 이량체를 형성케 하는 이황화결합을 이루게 하는 사슬내짝이 없는 시스테인의 위치가 사슬내의 이황화결합을 이루는 이황화결합짝이 있는 시스테인과 같이 반드시 서열상의 특별한 위치에 있어야만 이황화결합을 이루는 것이 아니고 연장사슬내의 가질 수 있는 위치가 매우 넓은 범위에서 가능하다는 것을 보여준다. 본 예시에서 사용된 연장사슬에 포함된 항체 경첩으로부터 유래하고 변형된 서열이 이량체 형성을 위한 이황화결합에 도움이 되었는가는, 선행의 실시예인 항체 경첩으로부터 유래하고 변형된 서열에 사슬내짝이 없는 시스테인을 갖고 있는 이[B3(FabH1)-PE38]2의 수득율이 0.016%이고 항체 경첩으로부터 유래하고 변형된 서열에 사슬내짝이 없는 시스테인을 갖고 있지 않고 정형의 구조를 갖지 않으리라고 보이는 유연한 서열 내에 사슬내짝이 없는 시스테인을 갖고 있는 [B3(Fab)-ext-PE38]2의 수득율이 0.06%로 증가함이 관찰되었지만, 본 실시 예에서 사슬내짝이 없는 시스테인의 위치를 중간의 위치에 넣었을 때 다시 수득율이 증가하였음이 확인됨으로 인해, 경첩서열의 융합체의 이량체 형성에 대한 영향에 대하여는 확실한 결론을 제시할 수 없다.

3) pMHS22의 제작에는 연장사슬(Ext)에 포함된 경첩으로부터 유래된 SKPCISTK 서열에서, 경첩이 상호 밀접한 거리에서 상호 작용할 경우에 세린(S)의 -OH 그룹이 입체적 방해를 하여 이량체 형성 수득율을 감소시킬 가능성을 줄이기 위하여 -OH 그룹이 없는 알라닌(A)으로 세린(S)을 모두 치환하였다. 또한, 이량체형성을 위한 사슬내짝이 없는 시스테인을 4번째 위치에 포함하고, 벌키(bulky)한 부피가 큰 라이신(K)을 유연한 아미노산인 글루타민(Q)로 치환한 AKPCIATQ로 변형시켰다. SKPCISTK의 서열을 갖는 pMH22에 의한 [B3(Fab)-Ext(4CF5X)-PE38]2 생산량과 AKPCIATQ의 서열을 갖는 pMHS22에 의한 [B3(Fab)-Ext(4CF5X)-PE38]2 생산량은 약 0.2%로 비슷하였다.

이번 실험을 통해서 접착성서열과 이종작용기의 융합체의 일종인 항체독소의 이량체 형성을 위해서는, 연장 펩타이드 내에서 이량체를 형성케 하는 이황화결합을 이루게 하는 사슬내짝이 없는 시스테인의 위치가 사슬내의 이황화결합을 이루는 이황화결합짝이 있는 시스테인과 같이 서열상의 특별한 위치에 반드시 있어야만 이황화결합을 이루는 것이 아니고 연장사슬내의 가질 수 있는 위치가 매우 넓은 범위에서 가능하다는 것을 확실히 결론지을 수 있다. 각각의 사슬내짝이 없는 시스테인의 위치와 이량체형서의 관계를 도 4에 보여주었다.

또한, 거대한 작용기인 PE38간에 발생하는 입체적 장애를 해소하기 위해 이량체 형성 이황화결합을 이루게 하는 사슬내짝이 없는 시스테인의 뒤에는 유연성 있는 펩타이드가 필요하며, 실험한 범위 내에서는 유연한 아미노산의 개수의 증가함에 따라 생성수득율이 증가함을 보았고, 유연사슬(F1x)내에 연속된 유연성 아미노산이 19개까지 있어 유연성 아미노산이 긴 연속된 유연펩타이드가 포함되어도 Fab와 PE38이 재접힘과정이 독립적으로 일어나는데 방해함이 없이, PE38이 뒤에서 돌아와 앞에 있는 Fab와 상호작용하여 PE38이나 Fab 재접힘이 상호방해를 함이 없이 이량체 형성을 위한 이황화결합도 정상적으로 생성되어 활성이 있는 이량체 [B3(Fab)-Ext(4CF5X)-PE38]₂의 형성을 방해하지 않음을 확실히 결론지을 수 있다.

- ▷ ([B3(Fab)-Ext(4CF5X)-PE38]₂의 정제)
- ▷ Refolded [B3(Fab)-Ext(4CF5X)-PE38]₂ 를 정제하기 위하여 본 분자의 PE부분에 음전하를 가지는 아미노산이 많이 존재하는 특성을 이용하여 음이온 교환수지를 이용하였다. 우선 투석한 sample 1L를 Q-sepharose column에 loading하여 Buffer A와 Buffer B로 elution하여 12% reducing, 8% nonreducing SDS-PAGE gel로 전기영동하였다. 재접힘된 단백질만을 모아서

Buffer A로 5배 희석한 후 다시 Source-Q column으로 정제하여 12% reducing, 8% nonreducing SDS-PAGE gel로 전기영동하였다. Divalent antibody-toxin이 존재하는 fractions만을 모아 다시 superdex 200 column으로 gel filtration을 하여 PBS로 elution 하여 보다 정제된 divalent 분자를 얻었다. 최종column 결과는 도 5에 나타내었다.

- (cytotoxicity assay 결과)
- 항체독소의 세포 살상력을 알아보기 위해서 4개의 cancer cell lines에 대해 세포살상 효과를 $^{3\text{H}}\text{-incorporation}$ 방법을 통해 시험하였다. PE38의 세번째 분역이 가지는 ADP-ribosylation 능력이 연장인자II (elongation factorII)를 불활성화 시켜 단백질 합성을 저해한다. 이 실험에서는 scFv-PE38를 비교기준 항체독소로 이용하였다. KB3-1 암세포는 음성대조 세포주로 사용하였다. ID50는 암세포에 대한 $[^{3\text{H}}\text{-leucine-}]\text{incorporation}$ 50% 감소되는데 필요한 항체독소의 농도이다.

> Cytotoxicity assay의 경우는 triplicate하여 세 번을 실시하였다. 세 값을 평균 내어 Cytotoxicity assay 결과를 평가하였다. 세 번의 Cytotoxicity assay가 포함하는 오차의 원인은 세포의 성장상태가 매우 조건에 민감하여 사용된 세포의 상태의 차이에서 기인한 것일 수 있고 또한 세 번의 assay에서 사용된 antibody-toxin은 invitro refolding을 통하여 개별적인 purification 과정을 거쳐서 분리된 것으로 invitro refolding 과정에서 active한 분자와 inactive한 분자가 섞여있을 수 있고 purification 과정을 거치면서 gel 상에서는 보이지 않는 antibody-toxin 아닌 다른 contaminant protein이 다르게 섞여있을 가능성 등을 들 수 있다. 그러나 세 번의 Cytotoxicity assay 결과가 약간씩 다르게 나왔더라도 그 값은 오차범위 내에서 동일하다고 볼 수 있다. 평균한 결과는 선행된 세포살상효과측정과 같이 단일접착가의 분자

와 같은 ID_{50} 값을 갖는 경우와 단일접착가의 분자보다 높은 세포살상력을 갖는 경우가 모두 관찰되었다. 이는 이전의 경우와 같이 세포 표면에서의 항원의 밀도와 구조적 조건에 따라 달리 관찰되는 현상이다. 항원의 입체적 구조에 관한 연구를 통해 그에 대한 지식이 쌓인다면 이러한 문제에 대한 이해의 폭이 늘어나 설명이 가능할 것이다.

> 2가 접착성의 이량체의 세포살상력이 단일가 접착성의 단량체보다 세포살상력이 뛰어난 종류의 암인 경우 이량체에 의한 암 치료는 종래의 단량체를 이용하여 같은 량을 투여한 경우보다 치료효과가 높을 것이다. 또한, 최소한의 치료효과를 보이는 치료효과범위 한계의 하한 값도 이량체가 갖는 증가된 접착성에 의해 단량체보다 적은 량을 투여하여도 같은 효과를 볼 수가 있기 때문에 치료에 필요한 투여량을 적게 할 수 있어 치료효과범위 한계의 하한 값도 작은 량으로 낮추게 될 것이다. 이는 간혹 생리활성작용을 하는 작용기가 가질 수 있는 부작용의 발생을 접착성이 강한 이량체를 사용함으로써 적은 량을 투여하고도 치료효과를 보게되어 작용기에 의한 부작용이 없이 치료에 성공할 수 있음을 의미한다.

» <실시예 2>

> 연장서열(Ext)의 15번 위치에 사슬내짝이 없는 시스테인을 갖고 유연사슬(F1x)이 유연한 아미노산 13개를 포함하는 길이 14개 아미노산으로 이루어진 항체-독소작용기 융합체의 이량체 형성과 그 작용효과

1> 본 실시예에서 B3(Fd)-ext-PE38을 새로이 제조하였다. 이 분자는 B3(Fd)-PE38의 연장사슬 SKPSISTKASGGPE의 네 번째 세린 뒤에 G4C(G4S)2의 유연성 펩타이드를 삽입하였다. 경첩 서열로부터 유래한 서열의 시스테인(Cys) 자리는 모두 세린(Ser)으로 변형시켜 이황화결합을 일으

키지 못하도록 하였다. B3(Fd)-ext-PE38의 구성은

B3(VH)-B3(CH1)-SKPSISTKASGGGGCGGGGSGGGGSGGPE-PE38과 같다. 연장 펩타이드 사슬에 존재하는 사슬내짝이 없는 시스테인(Cys)이 두개의 B3(Fd)-ext-PE38 단량체 사이에 이황화결합을 형성 한다. 사슬내짝이 없는 시스테인이 있는 곳은 연장사슬의 15번 아미노산의 위치로서 1번 위치에 사슬내짝이 없는 시스테인이 있는 선행실시예의 [B3(FabH1)-PE38]2 (pCE1의 분자)보다 접착 성서열인 Fab 뒤의 먼 곳이 위치시켜, 항체의 경첩으로부터 유래한 서열과 전혀 관계가 없는 위치에 넣어 사슬내짝이 없는 시스테인을 넣을 수 있는 서열상의 위치가 한정된 특별한 위치만이 가능한가를 확인해보고자 하였다. 사슬내짝이 없는 시스테인 뒤로부터의 유연사슬 펩타이드 서열에 유연한 아미노산을 13넣어 유연한 아미노산의 개수를 늘림으로써 두개의 PE38사이에 이량체 형성시의 입체적 공간의 여유가 생겨 상호 입체적 방해가 감소됨으로써 B3(Fab)-ext-PE38의 이량체 형성이 용이하게 일어나는가를 확인하고자 하였다.

➢ B3(Fab)-PE38에서 유도된 2가 접착성 면역독소는 1가 접착성 항체독소에 비하여 여러 장점을 갖는다. 첫째, 2가 접착성의 분자이기 때문에 결합 친화력이 높을 것이다. 둘째, 암세포에 대한 세포 살상력이 더욱 높을 것이다. 셋째, 혈액 순환계에서 높은 안정도를 가질 것이다. 유연성이 있는 연장 펩타이드가 짧은 [B3(FabH1)-PE38]2 가 낮은 재접힘과정 수득율을 갖는 것에 비해 [B3(Fab)-ext-PE38]2는 높은 수득율을 가질 것이라고 기대되면서 제작되었다 (Choi *et al.*, 2001).

3> (재료 및 방법)

4> B3(Fd)-ext-PE38융합 단백질을 발현하는 단백질의 제작은 주형인 pMC74(Fd-SKPSISTKASGGPE-PE38 단백질을 발현시키는 벡터) 와 Fd와 PE38사이에 존재하는 SKPSISTKASGGPE의 네 번째 세린 뒤에 삽입될G4C(G4S)2을 포함하는 4개의 프라이머를 사용한 스

플라이싱 연쇄증합반응(splicing PCR)을 통하여 이루어졌다. 프라이머 1 (T7promoter primer; 5-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA GA-3)은 B3(Fd)-SKPSISTKASGGPE-PE38의 5말단에 붙게된다. 프라이머 2는 (5-CCA GAT CCG CCA CCA CAT CCC CCT CCC CCG GAA GCT TTT GTA CTT ATG CT-3) G4C(G4S)2 서열의 일부를 갖고 있으며 TKAS서열에 붙는다. 프라이머 3은 (5-TGG TGG TGG CGG ATC TGG AGG TGG CGG AAG CGG AGG TCC CGA GGG CGG CAG-3) 프라이머 2와는 반대 방향이며 G4C(G4S)2 서열의 일부를 갖고 있고 GGPE 서열에 붙는다. 프라이머 4는 (5-GCC GCG GGT GCT GAA GCT GAC GTC GCC GCC GTC-3) PE38 분역의 *Sac*II 효소위치에 접합한다. 프라이머 1과 2는 Fd부분의, 프라이머 3과 4는 PE부분의 PCR 조각을 얻기 위해 사용되었다. PCR에 의해 만들어진 Fd와 PE 조각들을 정제하고 프라이머 1과 4를 이용하여 스플라이싱 PCR을 하였다. 스플라이싱을 하여 얻은 산물을 정제하여 주형 플라스미드인 pMC74(Fd-PE38을 발현하는 벡터)에 해당하는 부분과 *Nde*I 과 *Sac*II로 잘라 교체하였다.

- 5> 단백질 발현과 inclusion body 분리, 재접힘 과정과 단백질 분리, 세포살상 효과분석은 상기 실시예 1과 동일한 방법을 사용하였다.
- 6> (pCW1 발현벡터의 제작과 Inclusion body 분리)
- 7> [B3(Fab)-ext-PE38]2를 구성하는 B3(Fd)-ext-PE38 사슬을 발현시키는 pCW1의 구조를 도 6에 나타내었다. B3(Fd)-ext-PE38는 [B3(Fd)-SKPSISTKASGGPE-PE38]을 PCR에 의해 변형시킨 형태이다. 펩타이드 사슬 G4C(G4S)2는 [B3(Fd)-SKPSISTKASGGPE-PE38]의 KASGGPE의 S와 G사이에 삽입되었다.
- 8> 사용한 플라스미드와 프라이머는 각각 표5, 표6에 나타내었다.

9> 【표 5】

Name	Coding Proteins
pMC74	B3(Fd)-SKPSIST-KASGGPE-PE38REDLK
pMC75	B3(L)
pCW1	B3(Fd)-SKPSIST-KASG4C(G4S)2 GGPE -PE38REDLK

10> 【표 6】

Name of the primer	Sequence 5'-3'
Primer 1	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA GA
Primer 2	CCA GAT CCG CCA CCA CCA CAT CCC CCT CCC CCG GAA GCT TTT GTA CTT ATG CT
Primer 3	TGG TGG TGG CGG ATC TGG AGG TGG CGG AAG CGG AGG TCC CGA GGG CGG CAG C
Primer 4	GCC GCG GGT GCT GAA GCT GAC GTC GCC GCC GTC

1> pCW1의 염기 서열은 서열 분석을 통하여 확인하였다. 폴리펩타이드는 대장균(*E.coli*)에서 inclusion body 형태로 얻었다. Inclusion body 단백질의 순도는 densitometry 분석(TINA 2.0) 해 본 결과 40~60% 였다.

2> ([B3(Fab)-ext-PE38]2분자의 재접힘)

3> 각각의 inclusion body, B3(Fd)-ext-PE38 과 B3(L), 를 1:1 몰비로 넣어 재접힘과정을 실시하였다. 이전에 보고된 [Fab-CKPSISTKASGGPE-toxin]2 형태의 면역독소는 연장사슬의 첫 번째 위치에 사슬내짝이 없는 시스테인을 넣어 이황화결합을 유도한 형태였는데 재접힘과정 후 매우 낮은 생산량을 보였다(Choi *et al.*, 2001). 이것은 사슬내짝이 없는 시스테인의 위치가 Fab 서열에 너무 가깝고, 2개의 거대한PE간에 발생하는 입체적 장애를 극복하지 못한 것으로 해석할 수 있다. 해결 방안으로 사슬내짝이 없는 시스테인의 위치를 Fab 서열로부터 획기적으로 멀리 떨어지게 하고, F1x서열 내의 유연성 아미노산의 개수를 증가시켜 PE간의 입체적 충돌을 감소

시키고 PE 자신의 입체공간에서의 회전 자유도를 증가시켜 이량체의 형성을 향상시키기 위한 분자설계를 하였다. 연장 펩타이드 내에 존재하는 사슬내짝이 없는 시스테인이 이황화결합을 이루어 [Fab-Toxin]2를 형성하는데, 이황화결합이 일어난 위치에서 PE시작위치 까지는 GASQEND를 14개 포함하는 아미노산서열로 구성되었다. 낮은 이량체 생산량을 보였던 pCE1으로부터 만들어지는 Fd-CKPSISTKASGGPE-PE38의 이량체 분자는 이황화결합에서부터 PE시작부분까지 13개의 아미노산으로 구성되어 있다. Fd-SKPSISTKASGGGGCGGGGSGGGSGGPE-PE38도 이황화결합에서부터 PE시작부분까지 14개의 유사한 아미노산 개수를 갖고 있지만 재접힘과정에 의한 생산량은 pCE1으로부터 만들어지는 Fd-CKPSISTKASGGPE-PE38의 이량체 분자보다 4~5배 많은 0.06%로 관찰되었다. 그러므로 유연성 있는 아미노산의 증가된 삽입은 각각의 B3(Fab)-ext-PE38에 존재하는 PE간의 이량체 형성시의 입체적 반발을 감소시켜 재접힘 효율을 증가시킴을 알 수 있다.

14> ([B3(Fab)-ext-PE38]2의 정제)

15> Q-sepharose column에서 [B3(Fab)-ext-PE38]2 분자량에 해당되는 단백질 band를 확인할 수 있었다. Mono-Q column으로 정제하여 12% reducing, 8% nonreducing SDS-PAGE gel로 전기영동하였다. 이들을 모아 다시 superdex 200 column으로 gel filtration을 하여 10-12ml에 해당하는 fraction에서 보다 정제된 divalent 분자를 얻었다. 최종column 결과는 도 7에 나타내었다.

16> (cytotoxic assay 결과)

> 항체독소의 세포 살상력을 알아보기 위해서 [³H]-leucine-incorporation 방법을 사용하였다. 본 실시예의 결과는 3중복시료(triplicate sample)를 3번(three times) 반복 실험하여 얻은 결과로서 그 정확도가 매우 높은 실험결과이다. 이 실험에서는 scFv-PE40을 비교기준 항체독소로 이용하였다. KB3-1 암세포는 음성대조 세포주로 사용하였다. ID50은 암세포에 대한 [³H]-leucine-incorporation이 50% 감소되는데 필요한 항체독소의 농도이다. 2가 접착성 항체독소, [B3(Fab)-ext-PE38]2의 ID50 는 A431 세포주에서 4 ng/ml, CRL1739 세포주에선 1 ng/ml, MCF-7세포주에선 5 ng/ml로 측정되었다. 1가 접착성 항체독소인 B3(scFv)-PE40은 A431 세포주에서 5 ng/ml, CRL1739 세포주에선 12 ng/ml, MCF-7세포주에선 10 ng/ml로 높은 ID50을 보였다. 비교 기준으로 사용한 1가 접착성 항체독소인 B3(scFv)-PE40에 대한 결과는 이전에 보고된 바와 매우 일치한다 (Brinkmann *et al.*, 1991). B3(scFv)-PE40에 대한 ID50값은 매우 여러 번 측정된 값이기 때문에 기준으로 사용하기에 적절하며, B3(scFv)-PE40을 비교기준으로 사용하여 이 알려진 값을 실험에서 얻을 경우, 세포살상력실험에서 여러 가지 조건에 의해 도입될 수 있는 계통오차나 우연오차가 제거되었음으로 해석할 수 있다. 결과는 도 8과 표 7에 나타내었다. 이 결과는 CRL1739세포주에서 2가 접착성의 항체독소인 [B3(Fab)-ext-PE38]2 이 1가 접착성의 항체독소인 B3(scFv)-PE40 보다 12배 이상 높은 세포 살상력을 가짐을 보였다.

> 【표 7】

Cell line	Cytotoxicity (ID50; ng/ml) on cell lines of B3 antigen	
	scFv-PE40	[B3(Fab)-ext-PE38]2
A431	5	4
CRL1739	12	1
MCF7	10	5
KB3-1	>1000	>1000

» 12배의 세포 살상력 차이를 보인 CRL1739세포주는 위암세포 이다. 이것은 2가 접착성의 항체독소는 LeY 를 발현하는 암세포의 표면구조에 따라 LeY 항원을 발현하는 암세포에 대하여 더욱 높은 세포 살상력을 가질 수 있음을 의미한다. 만약에 LeY 항원이 매우 길고 유연한 구조 위에 존재하여 이들이 가까이 접근 할 수 있다면 2가 접착성의 항체독소가 2개의 LeY 항원에 동시에 결합할 수 있게 됨으로서 2가 접착성의 항체독소는 1가 접착성의 항체독소 보다 더욱 높은 친화력을 보일 것이다. 만약 LeY 항원이 유연성이 없는 구조 위에 존재하거나 상호간의 거리가 2가 접착성의 항체독소가 동시에 결합하기에 너무 먼 경우에는 2가 접착성의 항체독소는 1가 접착성의 항체독소와 같은 친화력을 가질 것이다. CRL1739 세포주는 본 실행예의 조건에서 길고 유연한 다당질체 구조 위에 LeY 항원을 갖고 있는 것으로 보이며 이로 인해 [B3(Fab)-ext-PE38]2 이 동시에 2개의 항원에 결합할 수 있는 것으로 보인다.

» 항원과 항체의 상호작용에 따라서 세포표면의 항원에 대한 항체의 결합은 세포의 성장을 자극 할 수 있다. 2가 접착성 면역독소의 매우 높은 농도에서 약간의 세포 성장을 관찰할 수 있었는데(Data not shown) 이것은 1가 접착성 항체독소에선 관찰되지 않았다. 기존에 보고되어 왔던 1가 접착성 B3항체 항체독소가 항원-항체간의 상호작용에 의해서 세포의 성장을 촉진한다는 사실은 보고된 적이 없었다. 세포성장 촉진에 관한 1가 접착성과 2가 접착성 항체독소 간의 차이는 연구할 과제로 남아있다.

1> <실시 예 3>

2> 연장서열(Ext)의 1번 위치에 시스테인을 갖고 유연사슬(Flx)이 유연한 아미노산 7개를 포함하는 길이 13개 아미노산으로 이루어진 항체-독소작용기 융합체의 이량체 형성

13> 이가접착성 항체독소 ([B3(FabH1)-PE38]2 = [B3(Fab)-CKPSISTKASGGPE-PE38]2)를 제작하는데 이용한 B3 항체와 PE의 유도체는 Fab 형태와 PE38의 형태이다. 이가접착성 항체독소는 B3 항체의 경가닥 2개와 PE38에 B3 항체의 Fd 부위가 연결된 가닥 2개로 구성되며, 분자량이 약 174.4kDa의 분자이다. 일가접착성 항체독소의 연장서열이 포함하고 있는 경첩으로부터 유래된 서열에는 경첩의 3개의 시스테인 잔기 중 뒤 쪽 2개의 시스테인 잔기는 세린으로 바꾸고 첫 번째 시스테인만을 이용하여 일가접착성 항체독소 간의 이황화결합을 통해 형성하도록 하였다.

14> (재료 및 방법)

15> 실시예 1과 동일한 방법을 사용하였다. 그 외,

MTT(3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide)는 최종농도를 0.5mg/ml 으로 시그마 제품을 사용하였다. 서열 분석을 위한 Cy5TM AutoReadTM sequencing kit는 Pharmacia Biotech 제품을 사용하였다. 사용한 플라스미드, 용액의 종류 및 조성은 표 8,9에 각각 나타내었다.

6> 【표 8】

Name	Coding Protein
pMC75	B3(L)
pCE1	B3(Fd)-CKPSISTKASGGPE-PE38
pMC74	B3(Fd)-SKPSISTKASGGPE-PE38
pMC76	B3(L)-KASGGPE-PE38

7>

【표 9】

LB Super broth (per liter)	
Bacto-tryptone	10g
Bacto-yeast extract	5g
NaCl	10g
MgSO ₄	0.05%
Glucose	2%
Sucrose solution	
Sucrose	20%
TrisHCl	30mM
EDTA (pH 8.0)	1mM
Solubilization buffer	
GuanidineHCl	6M
TrisHCl (pH 8.0)	0.1M
EDTA	2mM
Refolding buffer	
Tris HCl (pH 8.0)	0.1M
L-ArginineHCl	0.5M
GSSG (oxidized glutathione disulfide)	8mM
EDTA (pH 8.0)	2mM
Dialysis Buffer	
TrisHCl (pH 7.4)	20mM
Urea	100mM
Buffer A (pH 7.4)	
TrisHCl	20mM
EDTA	1mM
Buffer B (pH 7.4)	
TrisHCl	20mM
EDTA	1mM
NaCl	1M
Buffer C (pH 7.4)	
KH ₂ PO ₄	20mM
EDTA	1mM
(NaCl)	1M
PBS	

3>

크로마토그래피 칼럼은 상기 실시예 1과 동일한 방법을 사용하였다. 젤 여과 크로마토그래피

칼럼(Gel Filtration Chromatography Column)으로는 TOSOHAAS의 TSK-GEL G3000SW를 사용하였다.

- ▷ (B3(FdH1)-PE38을 발현하는 플라스미드 pCE1 제작)
 - ▷ 플라스미드 pCE1 (B3(FdH1)-PE38을 발현) 은 pMC74를 (B3(Fd)-PE38 = B3(Fd)-SKPSISTKASGGPE-PE38 을 발현) 변형한 것으로 연장서열이 포함하고 있는 경첩으로부터 유래된 서열에는 경첩의 3개의 시스테인 잔기 중 뒤 쪽 2개의 시스테인 잔기는 세린으로 바꾸고 첫 번째 시스테인만을 갖게 하기 위해 (pCE1은 B3(FdH1)-PE38 = B3(Fd)-CKPSISTKASGGPE-PE38 을 발현) PCR을 수행하였다. 플라스미드 pMC74를 주형(Template)으로 하여, 시발체(Primer)는 정시발체(Sense primer)로 5`-TAATACGACT CACTATAGGG AGA-3`의 서열을 갖는 T7 촉진자 시발체(Promoter primer)를 사용하였고, 역시발체(Antisense primer)로 5`-GGGAATTCAT TAAGCTTTG TACTTATGCT AGGCTTACAA CCACA-3`의 서열을 갖는 B3HGSS를 사용하여 3` 말단에서 일곱 번째에 있는 뉴클레오파이드(Nucleotide) 하나를 교체함으로써 세린을 시스테인으로 치환할 수 있도록 하였다.
- ▷ PCR을 통해 얻은 788bp의 가닥(Fragment)과 B3(L)-PE38을 발현시키는 pMC76을 제한효소 *Nde*I과 *Hind*III로 잘라 각각 693bp의 가닥과 4,178bp의 가닥을 젤상에서 정제하여 T4 DNA 연결효소(Ligase)를 이용하여 4,871bp의 pCE1을 얻었다. 시스테인이 되살려진 hinge 부위는 5`-TTGTTCCCAG CCGCGCGGCT GGGG-3`의 서열을 갖는 pRK79 *Hind*III up 시발체를 이용한 서열분석을 통해서 되살려짐을 확인하였다. 사용한 프라이머는 표 10에 나타내었다. B3(L)은 pMC75로부터 발현된다.

> 【표 10】

Name	Sequence
T7 promoter primer	5`-TAATACGACTCACTATAGGGAGA-3`
B3HGSS	5`- <u>GGGAAATTC</u> ATTAAGCTTT GTACTTATGCTAGGCTTACAACCACA-3`
pRK Hind III-up primer	5`-TTGTTCCCAGCCGCGCGCTGGCG-3`

>

B3(FdH1)-PE38과 B3L의 과량발현, 스피로플라스트와 봉입체의 정제, 봉입체의 정량 및 재접힘 과정, B3(FabH1)-PE38과 [B3(FabH1)-PE38]2의 정제는 상기 실시예 1과 동일한 방법을 사용하였다.

> 크기배제 젤 크로마토그라피 정제과정에서는 TSK-GEL G3000SW를 이용하여 B3(FabH1)-PE38과 [B3(FabH1)-PE38]2를 정제하였다. 용리완충용액(Elution buffer)은 TSK-GEL G3000SW에 대해서는 PBS(Phosphate buffered saline)를 사용하였다.

> (온도변화에 따른 [B3(FabH1)-PE38]2의 형성여부측정)

> Mono-Q로부터 용리된 B3(FabH1)-PE38를 37°C, 40°C, 45°C와 53°C에서 24시간 동안 열처리함으로써 [B3(FabH1)-PE38]2의 형성여부를 측정하였으며, 형성된 [B3(FabH1)-PE38]2는 Mono-Q를 통해 정제되었으며, 단백질 상태는 각각의 Fraction을 전기영동하여 알아보았다.

> (교차결합자를 이용한 [B3(FabH1)- PE38]2의 형성여부측정)

> 교차결합자, bis-maleimidohexane(BMH)와 1,11-bis- maleimidotetra ethyleneglycol(BM[PEO]4)를 이용하여 B3(FabH1)-PE38가 가지고 있는 시스테인의 티올기 (Thiol,-SH)끼리 결합시키기 위해 TSK-GEL G3000SW로부터 얻어진 B3(FabH1)- PE38과 교차결합자를 몰비가 6:1, 5:1, 4:1, 3:1, 2:1, 1:1과 1:3이 되도록 하여 반응완충용액(Reaction buffer)에서 반응시켰다. 단백질 상태는 전기영동을 하여 알아보았다.

> (정제된 단백질의 암세포에서 독성효과측정)

> 하기 설명된 사항 외에는 상기 실시예 1과 동일한 방법을 사용하였다. 정제된 B3(FabH1)-PE38과 [B3(FabH1)-PE38]2의 독성효과(Cytotoxic effect)를 알아보기 위해 MTT의 분해 정도에 따라 암세포의 생존도(Viability)를 측정하였다. 암세포를 항체독소와 배양한 후 5mg/ml의 MTT를 20 μ l씩 첨가하여 알루미늄 호일(Aluminium foil)로 싸서 37°C, 5% CO2 배양기에서 10시간 동안 방치한 후 환원된 MTT-formazan을 3,000rpm으로 4°C에서 15분동안 원심분리하여 MTT-formazan 결정을 가라앉히고, 200 μ l의 상층액을 제거한 후 0.016N 이소프로파놀 (Acidic isopropanol) 100 μ l를 첨가한 후 약 300rpm의 마이크로필터플레이트교반기 (Microfilter plate shaker)를 이용하여 MTT-formazan을 녹인 후 ELISA READER를 이용하여 570nm에서 흡광도를 측정하였다. 흡광도는 3개 시료의 평균값을 나타내었다.

1> (B3(FdH1)-PE38과 B3L의 과량발현)

2> 이용된 플라스미드 pCE1과 pMC75는 각각 *E. coli* BL21(DE3)에 삽입되어 62.6kDa의 긴사슬Long chain, B3(VH)-B3(CH1)-CKPSISTKASGGPE -PE38과 24.6kDa의 짧은사슬Short chain, B3(VL)-B3(CL) (=B3(L))을 과량발현시킨다.

- > 플라스미드 pCE1과 pMC75를 *E. coli* BL21(DE3)에 삽입하여 과량 발현시킬 때 IPTG를 첨가하는 유도점(Induction point)은 OD600이 1.6-1.8 정도가 적당한 것을 관찰할 수 있었다. OD600이 이보다 작거나 크면 단백질의 과량발현이 잘 안 되는 것을 관찰할 수 있었다.
- > (B3(FabH1)-PE38과 [B3(FabH1)-PE38]2의 정제)
- > 실시예1 과 동일한 방법을 사용하였다.
- > 정제된 B3(FabH1)-PE38과 [B3(FabH1)-PE38]2의 양은 4.3mg과 16.5 μ g으로 각각 재접힘에 이용한 B3(FdH1)-PE38과 B3L 총량의 3.8%와 0.016%인 것을 관찰할 수 있었다. 이량체인 [B3(FabH1)-PE38]2가 산출량이 매우 낮은 것은 다량의 B3(FdH1)-PE38과 B3L이 재접힘과정과 투석과정에서 엉겨 침전되어 소실되기 때문이며, 또한 3.8%의 B3 (FabH1)-PE38이 생성되지만 이 B3(FabH1)-PE38이 이황화결합을 통해 [B3 (FabH1)-PE38]2로 형성되지 않는 것은 B3(FabH1)-PE38에 가닥간 이황화결합을 위한 시스테인 잔기가 재접힘과정을 통해 Fab와/또는 PE38 과의 상호작용에 의해 이황화결합을 형성하기 어려운 위치에, 또는 방향성이 틀리게 고정되게 되거나, 이들이 형성하는 입체적 구조 공간의 한쪽으로 숨었거나, 시스테인 잔기 다음에 오는 리신(Lysine)의 결사슬이 커서 시스테인끼리 만나기가 매우 어려워 두 분자간 이황화결합을 형성이 매우 적게 일어나는 것으로 보인다. 그러나 본 실험에서 매우 어렵게 성공한 극히 소량으로 정제된 [B3(FabH1)-PE38]2는 재접힘과정에서 재접힘이 완전히 이루어지지 않았을 때 소량의 B3(FdH1)-PE38들 간의 이황화결합이 우연히 먼저 형성되어 Fab나 PE38과의 이황화결합을 방해받는 과정이 일어나기 전에 B3(FdH1)-PE38들 간의 이황화결합이 먼저 생긴 후, B3L과 이황화결합을 형성함 통해 이량체가 형성된 것으로 판단된다.

- › (온도변화에 따른 [B3(FabH1)-PE38]2의 형성여부측정)
 - › [B3(FabH1)-PE38]2의 형성이 매우 적기 때문에 B3(FabH1)-PE38을 고온에서 열처리함으로써 분자구조의 이완이 일어나게 하여 Fab와/또는 PE38과의 상호작용에 의해 시스테인들이 서로 만나지 못하고 산화과정을 통해 이황화결합을 이루지 못하는 환경을 극복하여 두 분자의 B3(FabH1)-PE38가 이황화결합을 통해 [B3(FabH1)-PE38]2가 형성하는지를 알아보았다. Mono-Q로부터 용리된 B3(FabH1)-PE38을 열처리했을 때 [B3(FabH1)-PE38]2의 형성은 45°C에서 가장 높은 것을 관찰하였다. 그러나 정상적인 [B3(FabH1)-PE38]2 뿐만 아니라 여러 가지 형태의 분자가 형성되는 것을 관찰하였다.
- › (교차결합자를 이용한 [B3(FabH1)-PE38]2의 형성여부측정)
 - › [B3(FabH1)-PE38]2의 산출량을 높이기 위한 방법으로 화학물질인 교차결합자(BMH와 BM[PEO]4)를 이용하여 B3(FabH1)-PE38의 두 분자간에 화학물질의 이황화결합을 통해 [B3(FabH1)-PE38]2를 얻고자 하였다. TSK-GEL G3000SW를 통해 얻은 B3(FabH1)-PE38과 교차결합자의 몰비를 6:1, 5:1, 4:1, 3:1, 2:1, 1:1과 1:3로 하여 반응을 하였으나 [B3(FabH1)-PE38]2의 형성을 거의 관찰하지 못하였다. 이 결과로 보아 B3(FabH1)-PE38에서는 교차결합자를 넣어 이량체를 형성하려 하여도 가닥간 이황화결합을 위한 시스테인 잔기가 재접힘과정을 통해 Fab와/또는 PE38과의 상호작용에 의해 교차결합자와의 결합을 형성하기 어려운 위치에, 또는 방향성이 교차결합자와 결합에 대해서는 틀리게 고정되게 되거나, 이들이 형성하는 입체적 구조 공간의 교차결합자와 연결되기에는 너무 안쪽으로 숨었거나, 시스테인 잔기 다음에 오는 리신(Lysine)의 결사슬이 커서 각 시스테인과 교차결합자끼리 만나기가 매우 어려워 두 분자간 이황화결합을 형성할 수 없는 것으로 추정할 수 있다.

> (정제된 단백질의 암세포에서 독성효과측정)

> 정제된 B3(FabH1)-PE38과 [B3(FabH1)-PE38]2의 암세포에서의 독성효과는 살아 있는 암세포의 마이토콘드리아의 탈수소효소(Dehydrogenase)의 작용에 의해 MTT-tetrazolium이 MTT-formazan으로 환원되는 정도에 따라 암세포의 생존도를 측정함으로써 알 수 있다. 이용된 암세포는 B3 항체에 대한 항원이 다량 존재하는 A431, MCF7과 CRL1739와 B3 항원이 존재하지 않는 KB3-1을 사용하였다. B3(scFv)-PE40은 PE이 세포결합부위(Cell binding domain)을 B3VH와 B3VL이 단가닥으로 연결된 사슬로 치환한 단백질로 양성비교구(Positive control)로 사용하였다.

B3(scFv)-PE40, B3(FabH1)-PE38과 [B3(FabH1)-PE38]2의 암세포에 대한 독성효과를 보면 B3(scFv)-PE40, B3(FabH1)-PE38과 [B3(FabH1)-PE38]2의 ID50값은 각각 약 61.3ng/ml, 30ng/ml과 10.3ng/ml인 것으로 측정되었다. 그러나 MTT측정방법은 MTT-tetrazolium이 미토콘드리아로 전달되는 것임으로 암세포마다 차이가 있어 오차가 있을 것이다. 하지만 B3(FabH1)-PE38과 [B3(FabH1)-PE38]2는 B3(scFv)-PE40에 비해 각각 약 2배와 6배의 독성효과가 있음을 관찰할 수 있었다. 그러나 양성 비교구를 기준의 자료를 보면 ID50값이 약 2-5ng/ml으로 알려졌으나 본 실험에서는 상당히 높게 나온 것을 알 수 있다. 이는 세포배양조건에 매우 민감하게 측정결과가 변하는 세포살상효과측정법의 어려움과 항체독소가 완전정제를 하지 못하고 불순단백질이 상당량 존재할 경우, 더욱이 사용한 MTT 측정방법은 그 실험 오차가 매우 실행 시마다 크게 나타나는 것으로 잘 알려져 있는 방법이므로 결과를 재확인하는 것이 바람직하다.

3> 결론적으로, (1) B3(FabH1)-PE38과 B3L을 과량 발현시켰을 때 B3(FabH1)-PE38과 B3L의 양은 세포질 내에서 발현되는 단백질의 약 17-25%를 차지한다.

(2) 재접힘과정에 B3(FdH1)-PE38과 B3L을 각각 총 82mg과 32.2mg을 이용하여 얻은 B3(FabH1)-PE38은 산출량이 약 4.3mg으로 3.8%이며, [B3(FabH1)-PE38]2는 산출량이 약 16.5 μ g으로 0.016% 였다

(3) 100배 빠른 재접힘과정을 통해 활성을 갖고 올바른 형태(Conformation)를 갖는 단백질의 산출량은 상당히 낮은데 비해 서로 엉겨 침전물(Aggregate)로 제거되는 양은 약 96% 이상으로 상당히 크다.

(4) 고온 열처리로 분자구조의 이완을 통한 [B3(FabH1)-PE38]2의 형성은 B3(FabH1)-PE38를 45°C로 열처리하였을 때 가장 많이 형성된다.

(5) [B3(FabH1)-PE38]는 BMH와 BM[PEO]4와 같은 길이가 긴 교차결합자에 의해서도 연결되어 이량체를 형성하지 않는다.

(6) B3(FabH1)-PE38간의 이황화결합에 이용되는 시스테인 잔기는 이황화결합을 형성하여 이량체를 형성하기에는 매우 어려운 환경에 존재하는 것으로 생각된다.

· (7) 과량의 시료를 재접힘 하여 얻어 정제한 B3(FabH1)-PE38과 [B3 (FabH1)-PE38]2는 양성비교구인 B3(scFv)-PE40보다 각각 약 2배와 6배 독성효과를 보인다.

> 8. [B3 (FabH1)-PE38]2의 산출량을 높이는 방법을 찾아 많은 양을 가지고 젤 여과 크로마토그래피에서 보다 깨끗하게 정제하여야 할 것으로 생각된다.

> <실시 예 4>

2> 연장서열(Ext)의 1,4, 6번 위치에 3개의 사슬내짝이 없는 시스테인을 갖고 유연사슬(Flx)내에 자기집합성(self affinity)이 있는 항체의 CH2, CH3 서열과 연속된 유연한 아미노산 서열(G4S)2을 포함하는 항체-독소작용기 융합체의 이량체 형성

3> 본 실시예에서는 연장사슬의 첫 부위 서열에 3개의 사슬내짝이 없는 시스테인을 과감히 위치시킴으로서 3개의 이황화결합에 의해 이량체가 형성되어 열역학적으로 매우 안정도가 높은 3중이황화결합으로 이루어진 이량체를 얻을 수 있는가를 알아보았다. 이는 자기 짹이 있는 시스테인을 가지고 있는 거대한 서열인 Fab와 거대한 작용기인 PE38이 사슬내짝이 없는 시스테인 3개가 연장사슬에 존재할 때 이들에 의한 이황화결합 뒤섞임을 당하지 않고 정상적인 활성을 갖는 Fab 부위와 PE38부위가 형성되는가를 알 수 있는 실험이다. 본 실행 예에서의 결과는 접착성서열과 작용기서열을 연장서열을 통하여 연결시키면서 그 연장서열에 이황화결합을 이를 짹이 없는 시스테인을 넣어 이 시스테인으로 하여금 이황화결합을 통한 이량체를 형성하게 하는 시도에서 가장 어려운 문제인 복수의 사슬내짝이 없는 시스테인으로 열역학적으로 월등한 안정성을 갖는 접착성서열-이종작용기 융합체의 이량체를 이를 수 있는가에 대한 답을 주는 실험이다. 복수의 사슬내짝이 없는 시스테인이 이웃하는 거대 서열들과 얼마나 독립적으로 행동하여 자기 짹을 정확히 찾아 기대하는 단량체 사이의 이황화결합에만 기여할지는 또는 이웃하는 거대 서열과 뒤섞여 버릴지는 모든 당업자들이 결과를 예측하기 어렵고 정상적인 분자의 형성을 의심하는 사항이다.

4> 본 실시예에서는 또한 이러한 단량체 내에 있는 사슬내짝이 없는 시스테인간의 이황화결합으로 이량체형성을 이루기 위해 단량체간의 시스테인들이 쉽게 가까이 접근할 수 있도록 자기친화도가 있다고 알려진 Fc, CH2, CH3 domain을 Flx서열에 도입하고 이러한 자기친화도가 있는 부위 뒤에는 유연한 연속된 아미노산서열을 넣어 [B3(Fab)-h(H123-CH2/CH3/Fc)- PE38R]2를

제작하였다. 현재까지의 연구결과 CH3 domain은 항원결합을 방해하지 않으면서 homodimerization을 유도하는 것으로 밝혀졌다.(Acpua et al., 1998, Ridgway et al., 1996.) 또한 CH3 domain은 CH2와 CH3 domain을 모두 가지고 있는 Fc domain에 비하여 항원 결합력 및 homodimerization 효과가 비슷한 것으로 나타났다. (Alt et al., 1999.) 따라서 본 연구에서는 Fab-toxin의 혈액 내에서의 안정성이라는 장점은 살리면서 Fc, CH2, CH3 domain의 도입으로 Fab-toxin의 homodimerization (Wu et al., 2001.)에 의한 이량체형성을 유도하여 [Fab-toxin]2의 안정성과 수득율을 높이고자 한다

5> 또한 monovalent molecule과 divalent molecule의 비교(Gall et al. 1999.)에서 실제로 divalent molecule의 항원에 대한 binding 효과가 더 좋은지에 대해서도 살펴보도록 하였다.

6> (재료 및 방법)

7> Protein expression system으로는 *E. coli* BL21(λDE3)를 사용하였다.

Fab-h(H123-CH2/CH3/Fc)-PE38 chain에 대한 유전자를 갖는 plasmid의 제작을 위하여 Fab-PE38 부분은 pMC74를 template로 하였고, Fc 부분은 human hinge(세개의 사슬내짝이 없는 시스테인을 포함)와 Fc를 지닌 pcDNA3 Cγ1을 template로 하여 각각의 chain을 제작하였다. Light chain은 pMC75의 5' 말단에 6xHis tagging된 pMCH75를 사용하였다. 각 chain의 plasmid의 이름과 제작 과정은 도 12, 13, 14 및 표 11에 나타내었다. 배지, 시약류, enzymes와 columns는 상기 실시예 1과 동일하다.

8>

【표 11】

Name	Coding Proteins
pLSC52	B3(Fd)-human(H123-Fc)-(G4S)2-KASGGPE -PE38REDLK
pLSC32	B3(Fd)-human(H123-CH3)-(G4S)2-KASGGPE -PE38REDLK
pLSC22	B3(Fd)-human(H123-CH2)-(G4S)2-KASGGPE -PE38REDLK
pMC74	B3(Fd)-SKPSIST-KASGGPE-PE38REDLK
pMCH75	H6-B3(L)

> (Plasmids 제작)

> Fc를 모두 포함하고 있는 pLSC52를 제작하기 위하여, pcDNA3C γ I을 template로 하여, hinge에서부터 Fc부분을 PCR하였다. 그리고 pMC74로부터 Fd부분을 PCR하여 두 fragment를 splicing PCR하였다. 이렇게 하여 만들어진 fragment를 다시 NdeI과 HindIII로 digestion 하여 pMC74를 NdeI과 HindIII로 digestion하여 얻은 large fragment를 vector로 하여 insertion 하고 원하는 plasmid를 제작하였다. CH2 또는 CH3를 포함하는 plasmid도 이러한 방법을 이용하여 제작하였으며, 각각은 pLSC22와 pLSC32라고 명명하였다. 제작에 사용된 프라이머는 표 12와 같다.

【표 12】

primer	Sequence 5'-3'
T7 primer	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA GA
Pr1-sing	AGG GAT TGT GGT GAG CCC AAA TCT TGT
Pr3-sing	CCA CCG TGC CCA GGG CAG CCC CGA GAA CCA
Pr4-sing	TAA CAC GGG TCC CTA ACA CCA CTC GGG TTT AGA
Pr5-sing	GAC AGA GGC CCA TTT CCG CCT CCG CCT AGG CCA CCA CCG CCA AGA TTT CGA ACC GG
Pr6-sing	TCG GGG CTG CCC TGG GCA CGG TGG GCA TGT
Pr7-sing	CCG GCC AAG CTT TAG AAC CGC CAC CAC CGG ATC CGC CTC CGC CTT TGG CTT TGG AGA T

단백질의 발현과 분리과정, Proteins의 refolding은 상기 실시예 1과 동일한 방법을 사용하였다. Refolding 조건은 LSC52 또는 LSC32 또는 LSC22와 MCH75의 mole 비가 1 : 1이 되면서 IT protein의 양이 40mg/5ml이 되도록 넣고 상기 실시예 1과 동일한 방법을 사용하였다. Refolded antibody-toxin의 정제는 실시예 1과 동일한 방법을 사용하였다.

Cytotoxicity assay는 Superdex200으로 분리된 [B3(Fab)-h(H123-Fc)-PE38]2, [B3(Fab)-h(H123-CH3)-PE38]2, [B3(Fab)-h(H123-CH2)-PE38]2, [B3(Fab)-h(H123-CH2)-PE38]의 cytotoxicity를 4가지 cell에 대하여 상기 실시예 1과 동일한 방법으로 실행하였다.

- (Plasmids의 제작과 발현)
- > [B3(Fab)-h(H123-CH2/CH3/Fc)-PE38]2를 만들기 위해 B3(Fd)-h(H123-CH2/CH3/Fc)-PE38을 encoding 하는 plasmid로써, pLSC22, pLSC32, pLSC52를 제조하였고, light chain은 pMCH75를 사용하였다.
- > T7 polymerase의 단백질 대량생산 방법을 통해 얻은 inclusion body 형태의 단백질은 12번의 반복을 통하여 평균적으로 38.2mg을 얻었다. 이는 각각 총 4L의 protein expression의 결과였다. PAGE gel 상에서 실제 항체독소가 차지하는 비율을 densitometry 분석(Tina 2.0)해 본 결과, 9번을 반복하여 평균적으로 heavy chain은 34.2%, light chain은 3번을 반복하여 평균적으로 40.9%였다. Inclusion body를 SDS-PAGE로 확인하였다. 이러한 항체독소의 순도는 refolding에 중요하며, refolding 후의 정제에도 영향을 준다. 그런 의미에서 볼 때 본 결과는 순도가 떨어지는 경향을 보이고 있다. 특히 실험을 진행하는 과정에서 항체독소의 순도가 26%일 경우에는 refolding 된 antibody-toxin이 나타나지 않았다. 이는 inclusion body의 순도가 protein

의 folding에 있어서 매우 중요한 역할을 한다는 것을 말해주고 있다. 따라서 본 실험에서는 inclusion body의 순도를 높이기 위해 그 동안 실험실에서 사용하던 inclusion body의 washing 과정인 25% Triton X-100를 2번 처리하는 것 이외에 추가로 4M Urea buffered Tris-Cl pH7.4를 3시간 처리하게 되었다. 그 결과로 inclusion body의 순도가 30% 이상을 유지하게 되었고, 이들은 원만한 protein folding이 이루어졌다.

(Proteins의 refolding)

Refolding과정 중의 이황화결합은 domain 내 사슬내에서 이루어지는 disulfide bond 형성과 두 chain 사이의 사슬간에서 형성되는 disulfide bond에 의해 생길 수 있다. pLSC22, pLSC32, pLSC52로부터의 B3(Fd)-h(H123-CH2/CH3/FC)-PE38과 pMCH75로부터의 light chain은 refolding solution 내에서 disulfide bond를 형성하며, B3(Fd)-h(H123-CH2/CH3/FC)-PE38 monovalent 분자 사이에서도 disulfide bond를 형성하여, divalent 분자를 생성한다.

- › (Refolded antibody-toxin의 정제)
- › 정제과정을 모두 마친 항체 독소들을 비교하였을 때, Fc를 지닌 $[B3(Fab)-h(H123-Fc)-PE38R]_2$ 은 refolding양이 매우 적게 나타났는데, 이는 molecule의 size가 비교적 커서 (divalent: 228kd) refolding이 이루어지는데 어려움 많아 결과적으로 refolding이 적게 일어났을 것으로 생각된다. 실험을 진행하면서 CH3 또는 CH2만을 지니고 있는 분자보다 두 domain을 모두 지니고 있는 $[B3(Fab)-h(H123-Fc)-PE38R]_2$ 의 경우 gel 상에서 refolding band 이외에 band가 끌리는 듯한 현상이 좀더 심한 것을 관찰할 수 있는데, 이는 $[B3(Fab)-h(H123-Fc)-PE38R]_2$ 의 경우 분자의 크기가 커서 refolding을 하는 과정에서 원하는 형태의 분자 이외에도 잘못된 형태의 분자가 많이 발생하기 때문인 것으로 생각된다.

그리고 CH3를 지닌 [B3(Fab)-h(H123-CH3)-PE38R]2은 superdex200 column에서 divalent과 monovalent로 여겨지는 band가 분리되지 않았다. 이는 superdex200 column에서 분리되어 나올 때는 모두 divalent의 형태의 이량체로 존재하다가, SDS-PAGE를 실시하는 중에 SDS에 의해 disulfide bond에 의하지 않은 즉, CH3의 affinity에 의해 divalent를 형성하고 있던 것이 떨어져 나와서 gel 상에서 분리되어 보이는 것으로 여겨진다. 즉 band의 intensity로 볼 때 hinge에 존재하는 disulfide bond에 의해 divalent를 형성한 것과 CH3의 affinity에 의해 divalent를 형성하는 양은 비슷한 것으로 보인다. 이로써 CH3 region은 Fab molecule의 homodimerization에 효과가 있는 것으로 생각되며 이 경우에서 사슬 내에 짹이 없는 시스테인의 숫자가 3개이어도 이들에 의한 재접합과정의 방해는 크게 일어나지 않고 정상적인 이량체가 형성됨을 알 수 있다. 본 분자에서 관찰된 사슬내짜이 없는 시스테인에 의한 이량체간의 이황화결합의 미성숙은 공기 중에 산소에 오랫동안 노출시킴으로서 성숙되어질 것이다. 이러한 이황화결합 미성숙의 현상은 당업자들 중 매우 숙련된 자들은 이미 경험하여 알고있을 것이다.

- › 마지막으로 CH2를 지닌 [B3(Fab)-h(H123-CH2)-PE38R]2은 divalent의 양은 적은데 반해, monovalent의 양은 상당히 많은 것을 볼 수 있다. 이는 CH3의 self-affinity가 CH2의 self-affinity보다 커서 CH3가 더 많이 divalent의 형성에 도움을 준다는 것을 다시 한번 역설적으로 보여주고 있다고 할 수 있다. 또한 CH2는 self-affinity가 뚜렷이 관찰된 바가 없고, 본 실험에서 CH2만을 갖고 있는 분자가 매우 적은 량의 이량체를 형성한다는 것을 관찰했다는 것은 연장서열에 3개의 사슬내짜이 없는 시스테인들이 집합적 성질을 갖는 부위의 도움이 없이도 단량체간에 이황화결합이 형성되어 이량체가 형성되는 것임을 알 수 있다.
- › (Cytotoxicity assay)

정제된 항체독소인 [B3(Fab)-h(H123-CH2/CH3/Fc)-PE38]2 분자들의 살상효과를 4개의 cancer cell line을 이용하여 알아보았다. 세포종류와 배양조건에 따라 단량체와 비슷한 살상력을 가지는 경우와 더 좋은 살상력을 가지는 경우 모두 관찰되었다.

(이량체 형성 수득율)

【표 13】

Refolding	[B3(Fab)-h(H123-Fc)-PE38]2	[B3(Fab)-h(H123-CH3)-PE38]2	[B3(Fab)-h(H123-CH2)-PE38]2
1st (240mg/3L)	148g 0.06%	455g 0.19%	198g 0.08%
2nd (80mg/1L)	44g 0.05%	146g 0.18%	78g 0.10%
3rd 80mg/1L)	47g 0.06%	162g 0.20%	59g 0.07%

분자의 수득율을 비교하여 보면, 이전에 설계된 [B3(Fab)-ext-PE38]2의 경우 Fab와 PE38 사이에 연장서열이 SKPSISTKASG4C(G4S)2GG로 존재하여 PE 분자 사이의 steric hindrance를 줄이고, divalent 분자의 형성을 유도하였다. 이 분자의 수득률은 0.06%였다.

본 실험에서는 CH3 domain의 affinity를 이용하여 dimerization을 유도하였는데, 그 수득율은 0.19%이었다. 이는 [B3(Fab)-ext-PE38]2의 경우와 비교하였을 때 약 3배정도 증가한 것을 나타낸다. 또한 CH2 domain을 이용한 수득율은 0.08%이었으며, Fc domain을 이용한 수득율은 0.06%이었다. 이러한 결과는 사용한 자기친화력을 갖는 부위들이 매우 커서 자신들의 재접힘과 정에서의 부담으로 인한 것으로 보이며, [B3(Fab)-ext-PE38R]2와 비슷한 결과로써 divalent molecule의 수득율 증가에는 그다지 기여하지 못하였지만 작은 크기의 친화력을 갖는 부위를 사용한다면 더 좋은 결과를 얻을 것을 당업자들은 쉽게 예측할 것이다. 특히 CH3 domain이 함 께 있는 [B3(Fab)-h(H123-Fc)-PE38R]2의 경우는 CH3 domain이 존재하나 분자의 크기가 너무 커서 바르게 folding 된 분자가 적게 나타나 수득율이 0.06%로 낮게 나타난 것으로 여겨진다.

위 결과에서 보듯이 자기친화도가 있는 서열을 F1x 서열에 첨가하여 사슬내짝이 없는 시스템 간의 접근을 유도하는 경우에는 3개의 시스테인간에도 접착부위와 작용기의 입체구조 형성에 방해를 함이 없이 3개의 이황화결합에 의해 이량체가 잘 형성됨을 알 수 있다. 또한 이렇게 생성된 3종 이황화결합에 의해 형성된 이량체의 경우 한 개의 이황화결합에 의해 이량체가 형성된 경우에 비해 상온에서 방치할 경우 그 분자가 오랫동안 정상적인 모양을 유지하며 단백질 분해효소에 의한 손상에도 저항성이 큰 것을 관찰할 수 있다.

<실시 예 5>

B3항체의 Fab를 접착성부위로 하고 cytosine deaminase를 작용기로 하는 융합체의 이량체형성; [B3(Fab)-cytosine deaminase]2

현재까지 암 치료에 대한 연구로서 단일 클론 항체, 단일 클론 항체-치료제, 독소 그리고 방사성 핵종 복합체 등 수 많은 연구들이 진행되어 왔다. 최근 수 년 동안 단일 클론 항체를 기반으로 하는 수많은 치료제들이 임상적으로 승인되었다(Rituxan, Herceptin, Panorex). 그리고 이 외에도 몇 가지 다른 치료제들이 임상실험 중에 있다.

- > 그러한 거대 분자들을 치료제 복합체로서 이용하여 solid tumor에 대한 성공적인 치료법이 되기 위해서는 tumor mass 내로의 투과 장애, 항원 이종, 복합 치료제의 효능, 그리고 암세포 내로의 단일 클론 항체로부터의 효과적인 분리 등을 극복해야만 한다.
- > 치료제 전달을 위한 대안적인 방법으로서 암 치료에 대한 두 단계를 거치는 접근 방법이 있다. 일단 복합체가 암세포에 결합하고 혈액 순환계로부터의 제거되면 항 암 prodrug는 목표

효소에 의해 촉매 되어 활성화된 drug로 변환된다. 분리된 drug는 tumor mass 내로 투과 가능하며 단일클론 항체-효소 복합체가 결합하거나 결합하지 않은 세포 모두를 제거 가능하다.

이러한 치료 방법을 Antibody-Directed Enzyme Prodrug Therapy(ADEPT)라 하는데 이는 효소-항체 복합체를 도입하여 암세포 표면에서 무해한 prodrug를 효소반응으로서 세포살상능력을 보유한 화합물로 선택적으로 변환될 수 있도록 하는 선택적인 암 치료를 위한 새로운 방법이다. 이 치료 방법은 처음 Bagshawe의 아이디어에 의해 1987년에 발표되었다.

ADEPT 작용의 첫 번째 단계는 항체-효소 복합체가 암세포 위치에 촉적되는 것이다. 시간이 경과하면 혈액과 정상 조직에는 복합체의 분해가 발생한다. 두 번째 단계는 독성이 없는 prodrug 가 투여되고, 이 prodrug는 암세포에 존재하는 복합체의 효소 부위에 의해 세포살상 효과를 보유한 drug로 변환된다.

이 방법은 암세포에 대한 특이성을 증가시킬 수 있을 뿐만 아니라 치료제를 직접 투여할 때보다도 암세포에 대하여 높은 농도의 치료제 운반을 기대할 수 있다. 또한 효소 한 분자가 다량의 prodrug를 세포 살상 drug로의 전환을 촉매 할 수 있는 종종 효과가 있으며, 활성화된 치료제는 낮은 분자량이기 때문에 암세포 내로의 확산이 용이하다. bystander 효과로서 암세포 주위의 암세포 항원을 발현하지 않는 암세포까지도 살상효과를 보인다. 이는 다른 항 암 치료법과는 다른 ADEPT의 고유한 특징이다.

> ADEPT에 적용 가능한 단일클론 항체, 효소, prodrug의 범위는 광범위하다. 그 중 효소부위로서 yeast cytosine deaminase는 cytosine을 uracil로 변환하도록 촉매작용을 하며 또한 임상적으로 사용되는 항 곰팡이제인 5-Fluorocytosine(5-FC)를 항 암 치료제인 5-Fluorouracil(5-FU)로 변환시킬 수 있다. 특히 효소로서 yeast cytosine deaminase는 이전의 연구에서 암 환자에 대한 효소-prodrug 치료법 사용 시 박테리아 효소보다 훨씬 더 큰 치료능력을 보유하고 있다

고 발표되었다. 그 외에도 yeast cytosine deaminase는 포유류 상동성을 보유하지 않은 비 포유류 근원이기 때문에 혈액과 정상세포에 존재하는 제한효소에 의해 prodrug의 활성을 방지할 수 있으며 translational modification 과정이 없기 때문에 큰 규모로 쉽사리 이용 가능하다. ADEPT에 적용하기 위한 prodrug 사용 시 잠재적인 문제점은 인체에 대한 약리적인 능력과 독성을 임상실험을 통하지 않고서는 알 수 없다는 것이다. 하지만 현재 임상적으로 사용되고 있는 5-FU는 다른 많은 화학치료로서 다루기 어려운 결장 암에 사용 가능하며, 또한 drug와 prodrug 모두 H2981 human lung adenocarcinoma 세포에 대한 살상능력이 측정되었다. 5-FU에 대한 IC₅₀ = 20 μ M 인 반면에 5-FC는 심지어 200 μ M 농도에서도 세포살상능력이 없다는 것으로 증명되었다.

이에 우리는 ADEPT에 적용할 재조합 [B3(Fab)-cytosine deaminase]2 융합 단백질 분자를 제작하였다. 그 이 분자는 Fab를 변형하여 divalent 형태로 만든 것이며, Fab형태의 장점인 분자 구조의 안정성과 동물 혈액 순환계 내에서의 긴 활동도 반감기를 그대로 유지하리라 예측되어 진다. 현재 제작하고자 하는 면역독소에 사용할 모델 항체분자는 B3항체로서 이것은 많은 고형 암세포표면에 발현하는 LeY계열의 당중합체를 항원으로 인식한다. B3항체분자는 내부의 hinge 지역에 3개의 이황화결합을 형성하여 divalent항체분자 구조를 이루고 있는 IgG이다. 이 hinge부위의 이황화결합 중 두 번째 것을 이용하여 monovalent Fab-enzyme의 형태를 divalent로 만들고자 한다. 이 분자는 divalent이기 때문에 binding affinity가 2배가 아닌 그 이상의 결합 친화도를 가질 것이라 예상되어지고, 단위 분자당 효소의 양도 2배 증가되어 있으므로 암세포 살상효과는 크게 증가 할 것이다. 또한 IgG의 구조에서는 두 개의 Fab부위가 hinge부위의 3개의 이황화결합에 의해 완전한 회전 자유도를 갖지 못하였지만 [B3(Fab)-enzyme]2는 회전자유도가 보장되므로 세포표면에 퍼져있는 항원에 대한 접착반응속도가 훨씬 빠를 것이다.

[B3(Fab)-cytosine deaminase]2가 divalent 형태로서 분자량이 큰 분자이지만 강한 평형상태 접착친화도, 높은 접착반응속도, 효소 투여량의 증가, 혈액순환계에서의 긴 활성도 반감기의 특성 때문에 Fv유도체보다 고형 암 조직 소멸 치료효과는 훨씬 증가할 것이다.

(재료 및 방법)

상기 실시예 1과 동일한 방법을 사용하였다. B3(Fd)-yCD에 대한 유전자를 갖는 plasmid의 제작을 위하여 *Saccharomyces cerevisiae*의 chromosomal DNA를 template로 하였고, Fab부분은 pMC74를 template로 하였다. Light chain은 3' 말단에 6xHis tagging된 pMCH75를 사용하였다. 배지, 시약류, enzymes와 columns은 상기 실시예 1과 동일한 방법을 사용하였다. 사용된 프라이머는 표 14와 같다.

▶ 【표 14】

primer	Sequence 5'-3'
Primer KL-1	GGC CCA TAT GCA TCA CCA TCA CCA TCA CGT GAC AGG GGG AAT G
Primer KL-2	TTG GTT TGA AGA TAT TGG TGA GTA GGA ATT CGG CC
Primer KL-3	GGC CCC CGA GGT GAC AGG GGG AAT G
Primer KL-4	GAA GAT ATT GGT GAG CAT CAC CAT CAC CAT CAC TAG GAA TTC GGC C
Primer KL-5	GGC CCA TAT GCA TCA CCA TCA CCA TCA CGA TGT GAA GCT GGT GGA GTC T
Primer KL-6	GGG AAT TCA TTA AGC TTG TGT AGC TAT GCA AGG CTT AGC ACC ACA

5> (Plasmids 제작)

6> B3(Fd)-yCD 융합 단백질을 발현하는 단백질의 제작은 우선 주형인 *Saccharomyces cerevisiae*의 chromosomal DNA에서 CDase 포함 부위를 다음의 2개의 프라이머를 사용한 연쇄증

합반응을 통하여 PCR 조각을 얻었으며 PCR에 의해 얻은 CDase부위를 정제하여 pMC74에 해당하는 부분과 교체하여 재조합 플라스미드 pKL1를 작제하였다.

프라이머 1 : 5'-GGC-CCA-TAT-GCA-TCA-CCA-TCA-CCA-TCA-CGT-GAC-AGG-GGG-AAT-G-3'

프라이머 2 : 5'-TTG-GTT-TGA-AGA-TAT-TGG-TGA-GTA-GGA-ATT-CGG-CC-3'

프라이머 1은 CDase의 5' 말단에 붙게된다. 프라이머 2는 CDase의 3' 말단에 붙어서 PCR에 의한 CDase의 정제에 사용되었다.

pKL1을 주형으로 하여 다음의 2개의 프라이머를 사용한 연쇄증합반응을 통하여 CDase 조각을 얻은후 pMC22의 PE 부분과 교체하여 pKL2를 작제하였다.

- 프라이머 3 : 5'-GGC-CCC-CGA-GGT-GAC-AGG-GGG-AAT-G-3'
- 프라이머 4 : 5'-GAA-GAT-ATT-GGT-GAG-CAT-CAC-CAT-CAC-CAT-CAC-TAG-GAA-TTC-GGC-C-3'
- > 프라이머 3은 CDase의 5' 말단에 붙게된다. 프라이머 4는 6개의 His(히스티딘)을 가지며 CDase의 3' 말단에 붙어서 PCR에 의한 CDase의 정제에 사용되었다.
- > pKL2는 B3(Fd)-SKPCISTKAS-GGGGSGGGGS-GGPE)-CDase-6His 를 갖는다.
- > pKL1의 CDase 부위를 pKL2의 CDase부위에 교체하여 pKL3을 작제하였다. pKL3는 B3(Fd)-SKPCISTKAS-GGGGSGGGGS-GGPE-CDase로서 6개의 His(히스티딘)을 3' 말단에 가지지 않는다.

pKL4의 작제는 다음과 같다. 주형인 pMC74를 사용하여 2개의 프라이머를 사용하여 연쇄증합반응에 의한 5' 말단에 6개의 His(히스티딘)을 가지는 Fd 조각을 얻어 pKL3의 해당부위와 교체하여 pKL4 : 6His-B3(Fd)-AKPCIATQAS-GGGSGGGS-GGPE)-CDase 를 작제하였다.

프라이머 5 : 5'-GGC-CCA-TAT-GCA-TCA-CCA-TCA-CCA-TCA-
CGA-TGT-GAA-GCT-GGT-GGA-GTC-T-3'

프라이머 6 : 5'-GGG-AAT-TCA-TTA-AGC-TTG-TGT-AGC-TAT-
GCA-AGG-CTT-AGC-ACC-ACA-3'

프라이머 5는 6His를 가지며 Fd부분에 붙는다. 프라이머 6은 AKPCIATQAS를 가지며 Fd 3' 말단에 붙는다.

플라스미드 pKL4의 염기 서열은 ALFexpress Dideoxy Sequencing Kit (Amersham Pharmacia)를 이용하여 서열 분석을 통하여 확인하였다

단백질의 발현과 분리, Proteins의 refolding, Refolded antibody-toxin의 정제는 상기 실시예 1과 동일한 방법을 사용하였다.

- > Cytotoxicity assay는 Superdex200으로 분리된 [B3(Fab)-CDase]2의 cytotoxicity를 4가지 cell에 대하여 검사하였으며 상기 실시예 1과 동일한 방법을 사용하였다.
- > 선행 실시 예에서와 같이 접착부위의 활성과 작용기의 활성을 정상적으로 지니는 분자를 정제 할 수 있었다. 정제된 분자들에 대하여 접착부위의 접착활성과 작용기서열인 cytosine

leaminase의 효소 활성 정상적임을 확인하였다. 생성된 이량체는 배양세포에 대하여 기질인 β -플로로사이토신과 같이 처리하였을 때 좋은 살상효과가 있음을 보여주었다.

【발명의 효과】

본 발명의 2배 접착성 키메라 재조합 접착도메인(B)-이종작용기(F) 융합체 이량체는 단량체 사이의 이황화결합 가교로 형성되어 2배 접착성을 갖게 한 최초의 경우이며, 이러한 이량체는 단량체에 비해 표적에 대한 작용 효과가 우수하며, 상기 특징을 갖는 유연사슬(F1x)을 포함하는 경우 생성수득율이 높으므로 이는 의약 산업상 매우 유용한 발명인 것이다.

【특허청구범위】

【청구항 1】

키메라 재조합 접착도메인-이종작용기 융합체에 있어서, 접착도메인(B)의 끝에서부터 이어지는 연장 아미노산 서열(Ext)에 이종작용기를 부가하는 것을 특징으로 하며, 상기 연장 아미노산 서열(연장사슬)에는 사슬내짝이 없는 시스테인(cysteine)이 포함되어 있는 것을 특징으로 하는 접착도메인-연장사슬 융합체 [B-Ext] (a) 또는, 상기 연장 아미노산 서열(연장사슬)은 사슬내짝이 없는 시스테인이 포함되어 있으며 상기 연장사슬(Ext)에 포함된 사슬내짝이 없는 시스테인 중 마지막 시스테인으로부터 연장사슬(Ext)의 끝부분 간에는 펩타이드 링커(L)로 구성되는 것을 특징으로 하는 접착도메인-연장사슬 융합체 [B-Ext(L)] (b) 또는, 상기 연장 아미노산 서열(연장사슬)은 사슬내짝이 없는 시스테인이 포함되어 있으며 상기 연장사슬(Ext)에 포함된 사슬내짝이 없는 시스테인 중 마지막 시스테인으로부터 연장사슬(Ext)의 끝부분 간에는 펩타이드 링커(L)로 구성되며 상기 펩타이드 링커(L)는 같은 것끼리의 동형(자기)친화도(homomeric self affinity)를 갖거나 또는 다른 것과의 이형친화도(heteromeric affinity)를 갖고있어 서로 접합하는 집합성을 갖는 도메인(homomeric multimer)나 heteromeric multimer를 형성하는 도메인, Affinity Domain, AD)을 포함하는 것을 특징으로 하는 접착도메인-연장사슬 융합체 [B-Ext(LAD)] (c) 또는,

상기 연장 아미노산 서열(연장사슬)은 사슬내짝이 없는 시스테인이 포함되어 있으며 상기 연장사슬(Ext)에 포함된 사슬내짝이 없는 시스테인 중 마지막 시스테인으로부터 연장사슬(Ext)의 끝부분 간에는 펩타이드 링커(L)로 구성되며 상기 펩타이드 링커(L)가 벌키(bulky)하지 않은 아미노산인 G(글리신) 또는 A(알라닌) 또는 S(세린) 또는 Q(글루타민) 또는 E(글루탐산) 또는 N(아르파라긴) 또는 D(아스파르트산)을 포함하는 유연한 (flexible) 아미노산 서열의 펩타이드

링커(LFA)로 구성되는 것을 특징으로 하는 접착도메인-연장사슬 융합체 [B-Ext(LFA)] (d) 또는, 연장 아미노산 서열(Ext)에 사슬내짝이 없는 시스테인이 포함되어 있으며 상기 연장사슬(Ext)에 포함된 사슬내짝이 없는 시스테인 중 마지막 시스테인으로부터 연장사슬(Ext)의 끝부분 간에는 펩타이드 링커(L)로 구성되며 상기 펩타이드 링커(L)는 같은 것끼리의 동형(자기)친화도(homomeric self affinity)를 갖거나 또는 다른 것과의 이형친화도(heteromeric affinity)를 갖고 있어 서로 접합하는 접합성을 갖는 도메인(homomeric multimer)나 heteromeric multimer를 형성하는 도메인)을 포함하며 상기 펩타이드 링커(L)가 벌키(bulky)하지 않은 아미노산인 G(글리신) 또는 A(알라닌) 또는 S(세린) 또는 Q(글루타민) 또는 E(글루탐산) 또는 N(아르파라긴) 또는 D(아스파르트산)을 포함하는 유연한 (flexible) 아미노산 서열의 펩타이드 링커(LADFA)로 구성되는 것을 특징으로 하는 접착도메인-연장사슬 융합체 [B-Ext(LADFA)] (e)에 이 종작용기(F)를 부가하는 것을 특징으로 하는 키메라 재조합 접착도메인-연장사슬-이종작용기 융합체 [B - Ext or Ext(L) or Ext(LAD) or Ext(LFA) Ext(LADFA) - F].

【청구항 2】

접착도메인(B)이 다중의 사슬로 구성되는 키메라 재조합 접착도메인-이종작용기 융합체에 있어서, 접착도메인을 구성하는 하나의 사슬의 끝에서부터 연장 아미노산 서열(Ext)이 이어지며, 상기 연장 아미노산 서열(Ext)에는 사슬내짝이 없는 시스테인을 포함하는 것을 특징으로 하는 [접착도메인사슬1-연장사슬, 접착도메인사슬2] 융합체 [B1-Ext, B2] (a) 또는, 상기 연장 아미노산 서열(Ext)에는 사슬내짝이 없는 시스테인을 포함하며 시스테인 뒤에는 같은 것끼리의 동형(자기)친화도 (homomeric self affinity)를 갖거나 또는 다른 것과의 이형친화도 (heteromeric affinity)를 갖고 있어 서로 접합하는 접합성을 갖는 도메인 (homomeric multimer

† heteromeric multimer를 형성하는 도메인)을 포함하는 것을 특징으로 하는 [접착도메인사슬1-연장사슬, 접착도메인사슬2] 융합체 [B1-Ext(AD), B2] (b) 또는, 상기 (a) 또는 (b) 융합체에 접착도메인을 구성하는 또다른 사슬의 끝에서부터 폴리펩타이드 링커(L)를 더욱 부가하는 것을 특징으로 하는 [접착도메인사슬1-연장사슬(Ext or Ext(AD)), 접착도메인사슬2-폴리펩타이드링커(L)] 융합체 [B1-Ext or Ext(AD), B2-L] (c) 또는, 상기 (c) 융합체의 폴리펩타이드 링커(L)가 벌키(bulky)하지 않은 아미노산인 G(글리신) 또는 A(알라닌) 또는 S(세린) 또는 Q(글루타민) 또는 E(글루탐산) 또는 N(아르파라진) 또는 D(아스파르트산)을 포함하는 유연한 (flexible) 폴리펩타이드 링커 (LFA)로 이루어지는 것을 특징으로 하는 [접착도메인사슬1-연장사슬(Ext or Ext(AD)), 접착도메인사슬2-유연폴리펩타이드링커(LFA)] 융합체 [B1-Ext or Ext(AD), B2-LFA] (d)에 이종작용기(F)를 부가하는 것을 특징으로 하는 키메라 재조합 접착도메인-이종작용기 융합체.

【청구항 3】

제1항 또는 제2항의 키메라 재조합 접착도메인-이종작용기 융합체가, 제1항 또는 제2항에 열거된 접착도메인-연장사슬(Ext) 융합체 또는 제1항 또는 제2항의 접착도메인-이종작용기 융합체의 연장사슬(Ext)에 포함된 사슬내짝이 없는 시스테인간의 산화에 의해 이황화결합 가교를 형성함으로써 이량체가 이루어짐을 특징으로 하는, 키메라 재조합 접착도메인-이종작용기 융합체의 이량체.

【청구항 4】

제1항 또는 제2항에 있어서, 아미노 말단으로부터 카르복시 말단으로의 순서가 접착도메인-연결서열-작용기인 것을 특징으로 하는 키메라 재조합 접착도메인-이종작용기 융합체.

【청구항 5】

제1항 또는 제2항에 있어서, 아미노 말단으로부터 카르복시 말단으로의 순서가 작용기-연결서열-접착도메인인 것을 특징으로 하는 키메라 재조합 접착도메인-이종작용기 융합체.

【청구항 6】

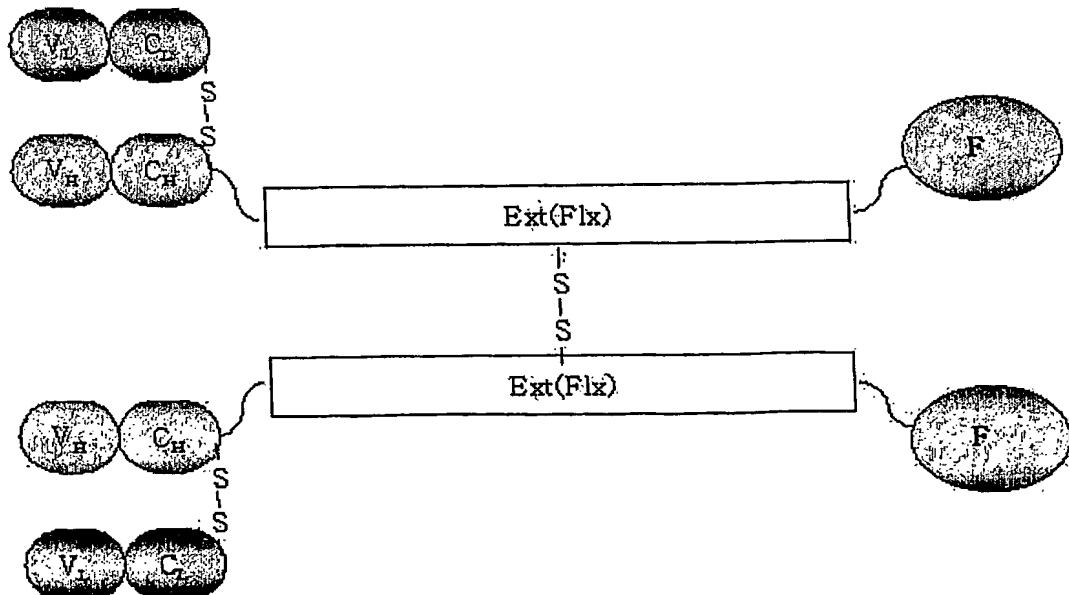
제1항 또는 제2항에 있어서, 접착도메인은 항체 또는 항체의 접착성을 보유하는 조각을 구성하는 아미노산 서열임을 특징으로 하는 키메라 재조합 접착도메인-이종작용기 융합체.

【청구항 7】

제1항 또는 제2항에 있어서, 접착도메인은 항체의 Fab 단편임을 특징으로 하는 키메라 재조합 접착도메인-이종작용기 융합체.

【청구항 8】

제3항에 있어서, 접착도메인은 하기와 같은 구조임을 특징으로 하는 키메라 재조합 접착도메인-이종작용기 융합체.



상기식에서, V_L 은 단일클론 항체의 경쇄의 가변영역을 나타내고;

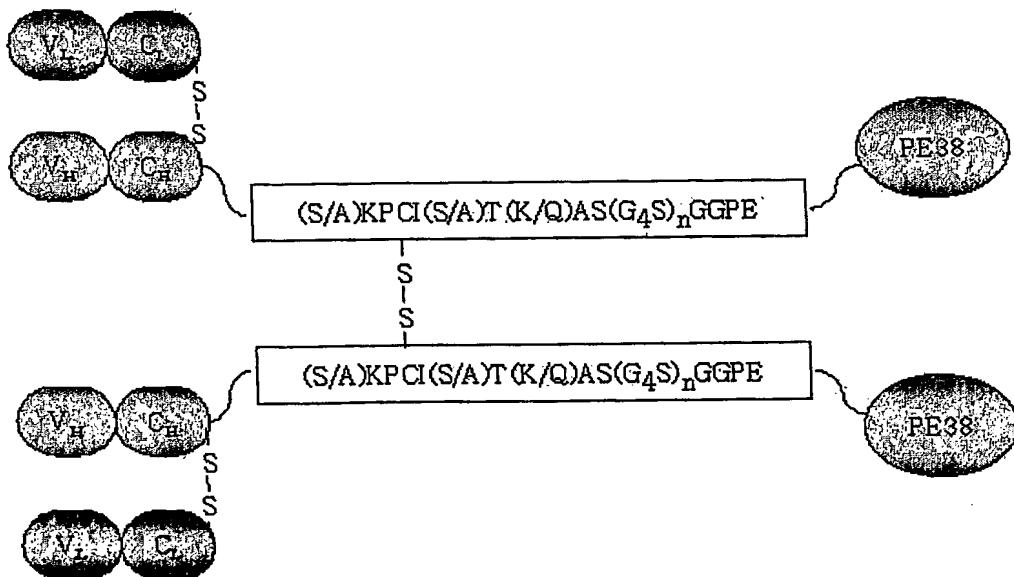
C_L 은 단일클론 항체의 경쇄의 고정영역을 나타내고;

V_H 는 단일클론 항체의 중쇄의 가변영역을 나타내고;

C_H 는 단일클론 항체의 중쇄의 고정영역을 나타낸다.

【청구항 9】

제3항에 있어서, 접착도메인은 하기와 같은 구조임을 특징으로 하는 키메라 재조합 접착도메인-이종작용기 융합체.



상기식에서, V_L 은 단일클론 항체의 경쇄의 가변영역을 나타내고;

C_L 은 단일클론 항체의 경쇄의 고정영역을 나타내고;

V_H 는 단일클론 항체의 중쇄의 가변영역을 나타내고;

C_H 는 단일클론 항체의 중쇄의 고정영역을 나타내고;

A는 아미노산 알라닌을 나타내고;

C는 아미노산 시스테인을 나타내고;

E는 아미노산 글루탐산을 나타내고;

G는 아미노산 글리신을 나타내고;

I는 아미노산 아이소루신을 나타내고;

K는 아미노산 라이신을 나타내고;

P는 아미노산 프롤린을 나타내고;

Q는 아미노산 글루타민을 나타내고;

S는 아미노산 세린을 나타내고;

T는 아미노산 트레오닌을 나타내고;

n은 1 또는 2 또는 3을 나타내고;

PE38은 녹농균 외독소의 도메인 I 및 도메인 II에서 세포 살상에 불필요한 부분의 아미노산이 제거된 38kDa의 녹농균 외독소 유도체를 나타낸다.

【청구항 10】

제1항 또는 제2항의 키메라 재조합 접착도메인-이종작용기 융합체를 생성하는데 사용되는 폴리펩타이드.

【청구항 11】

제1항 또는 제2항의 키메라 재조합 접착도메인-이종작용기 융합체를 생성하는데 사용되는 폴리펩타이드를 코딩하는 유전자를 포함한 재조합 플라스미드.

【청구항 12】

제1항 또는 제2항의 키메라 재조합 접착도메인-이종작용기 융합체를 생성하는데 사용되는 폴리펩타이드를 코딩하는 유전자를 포함한 재조합 플라스미드를 포함하는 숙주 세포.

【청구항 13】

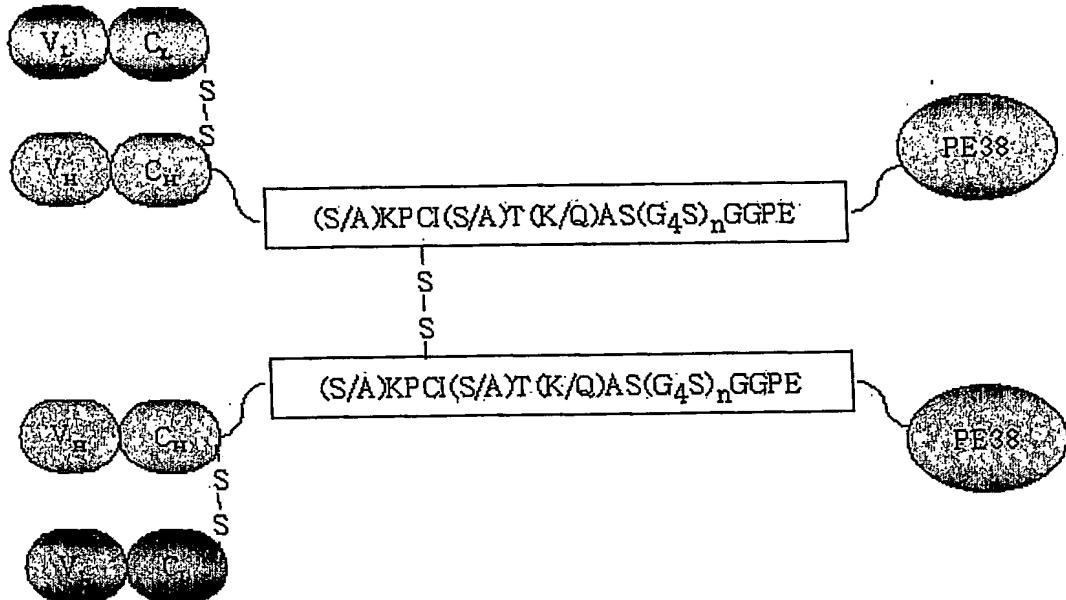
제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 키메라 재조합 접착도메인-이종작용기 융합체를 포함하는 약제학적 조성물.

【청구항 14】

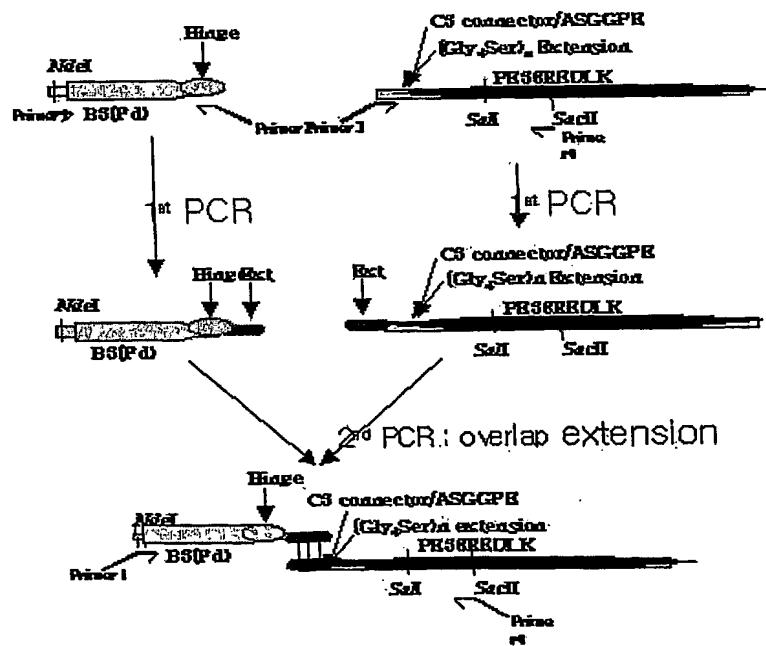
제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 키메라 재조합 접착도메인-이종작용기 융합체를 제조하는 방법.

【도면】

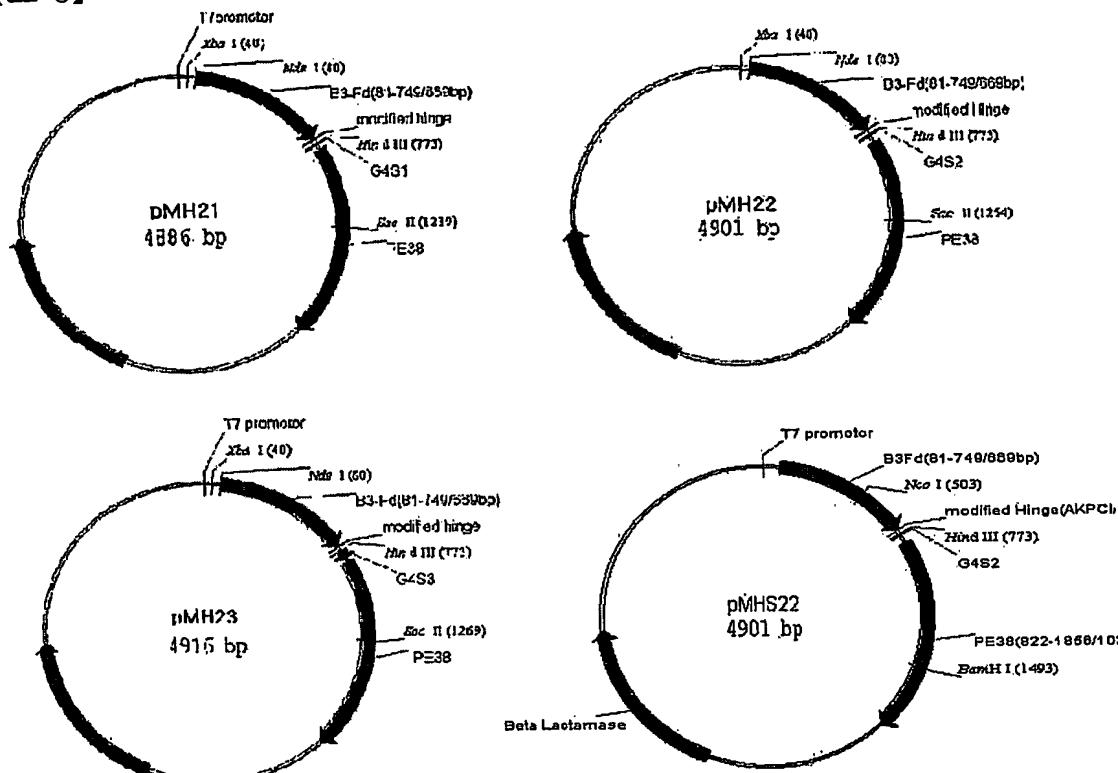
【도 1】



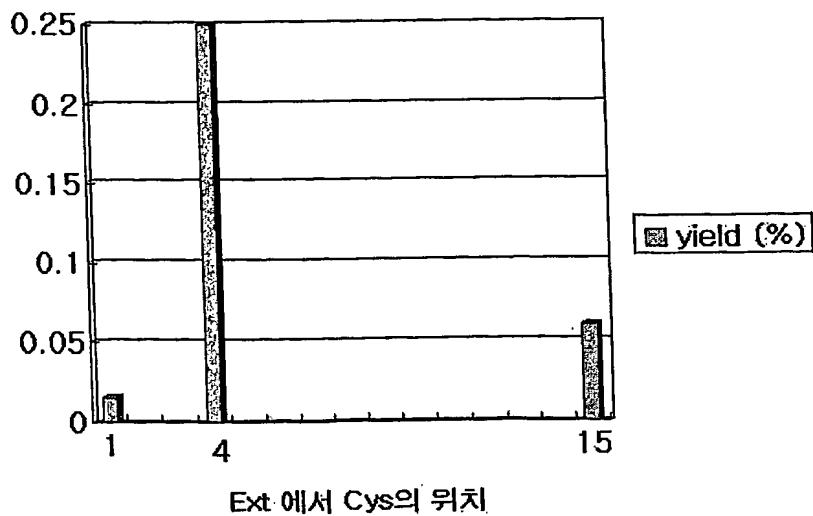
【도 2】



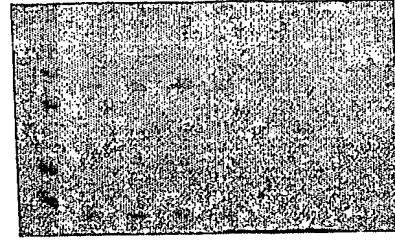
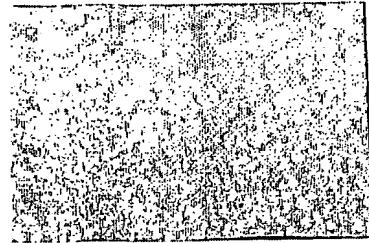
【도 3】



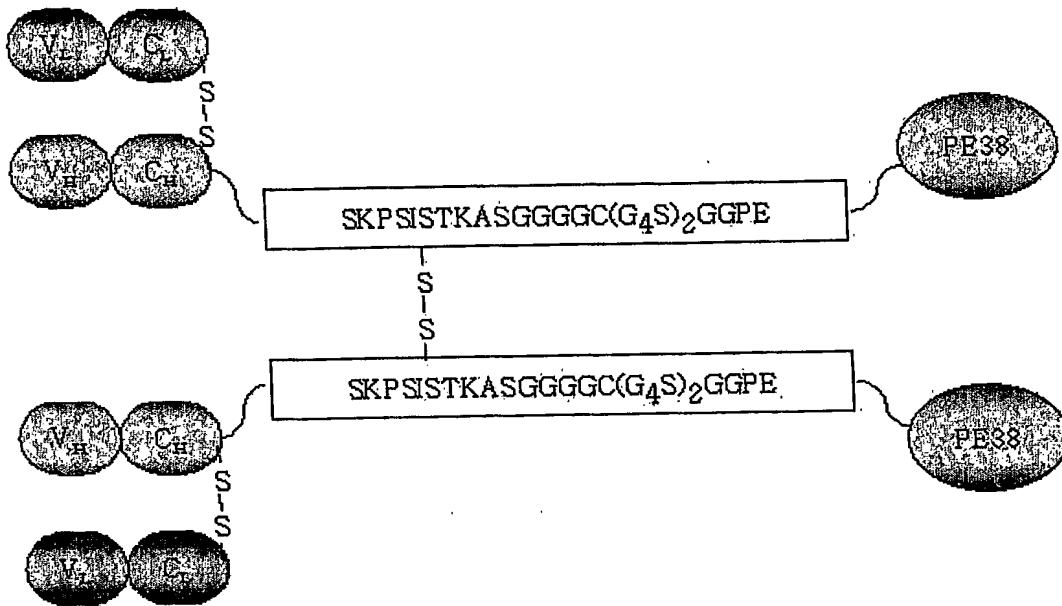
【도 4】



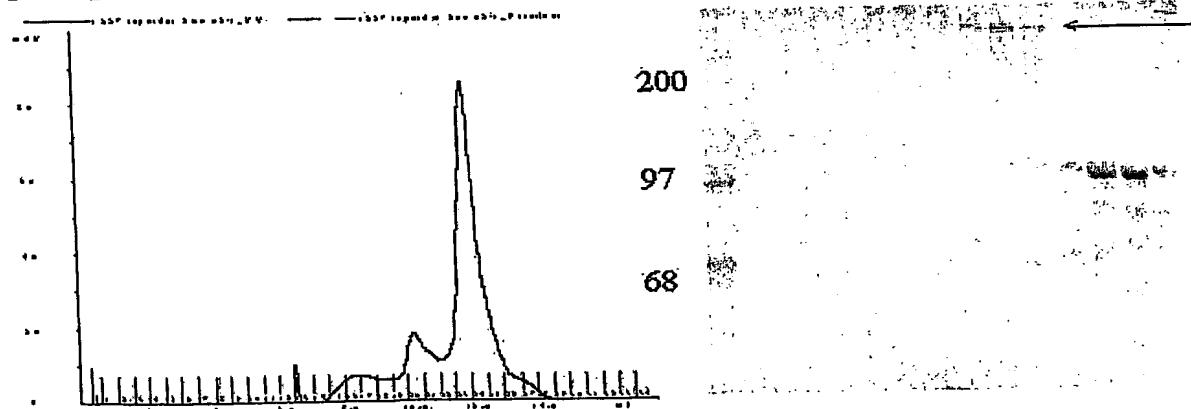
【도 5】



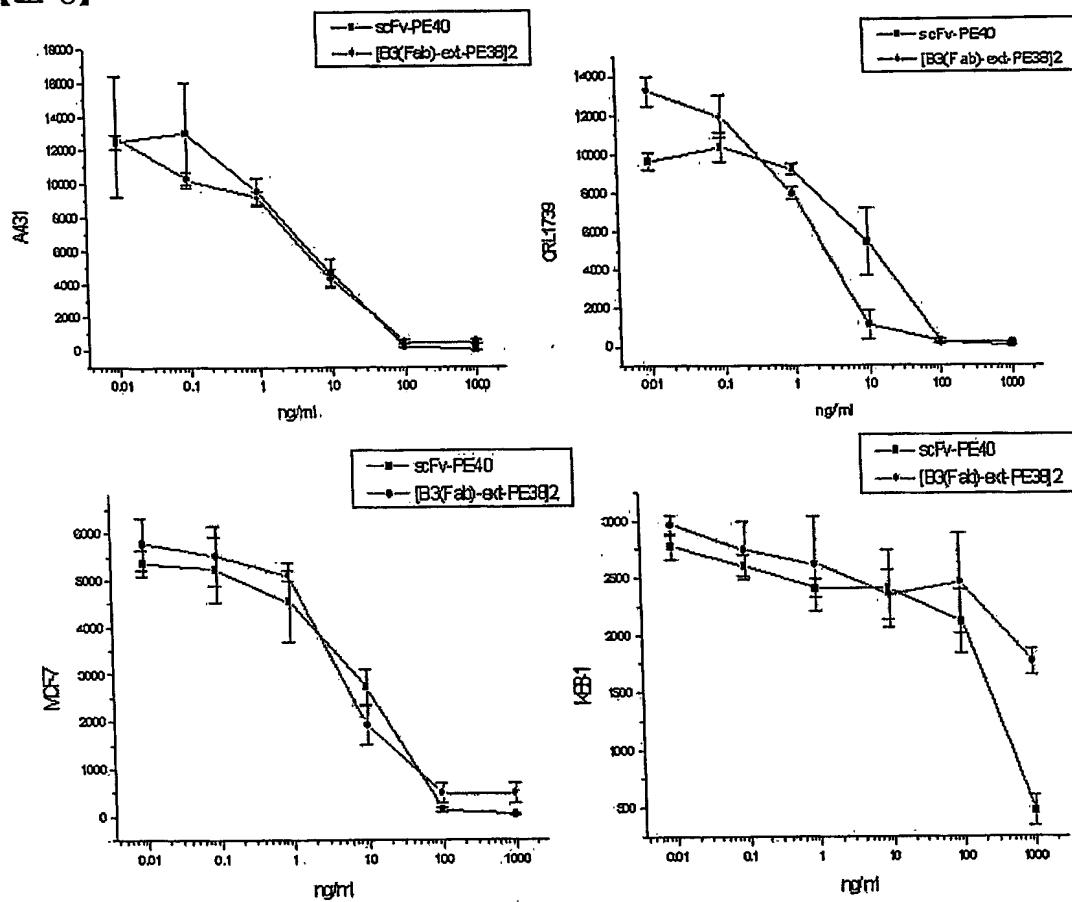
【도 6】



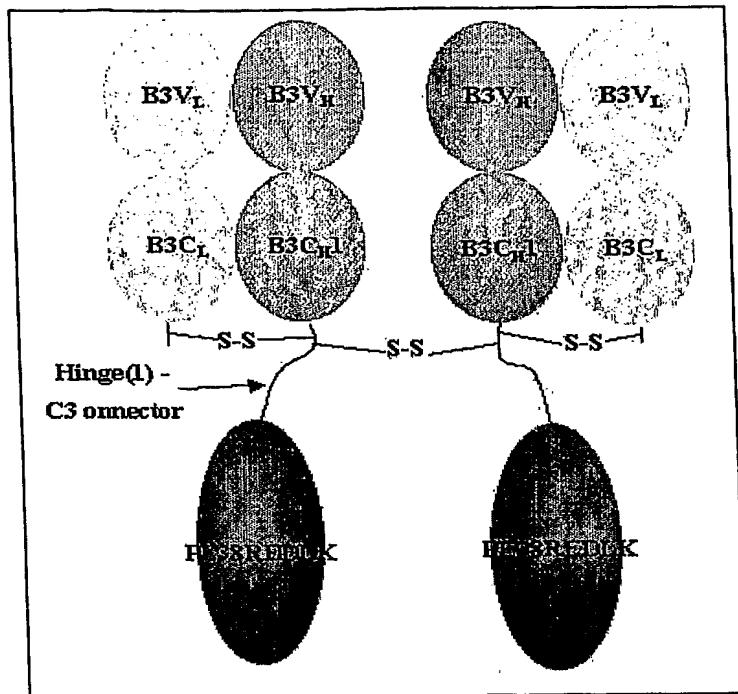
【도 7】



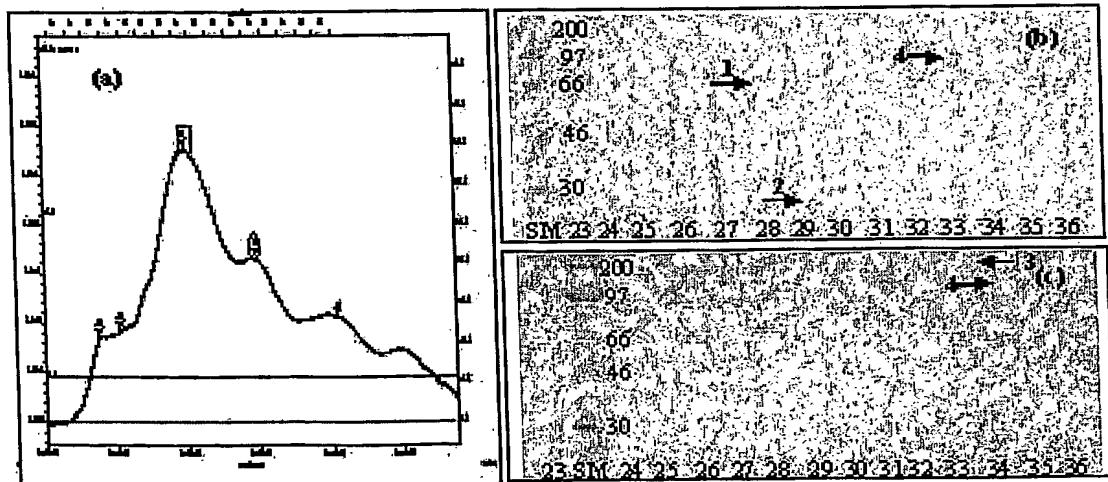
【도 8】



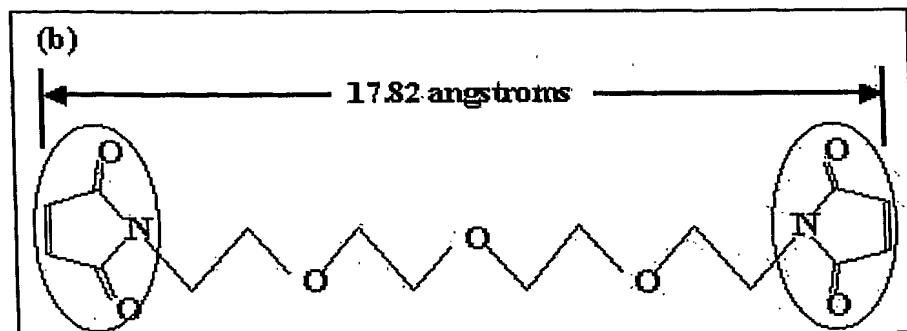
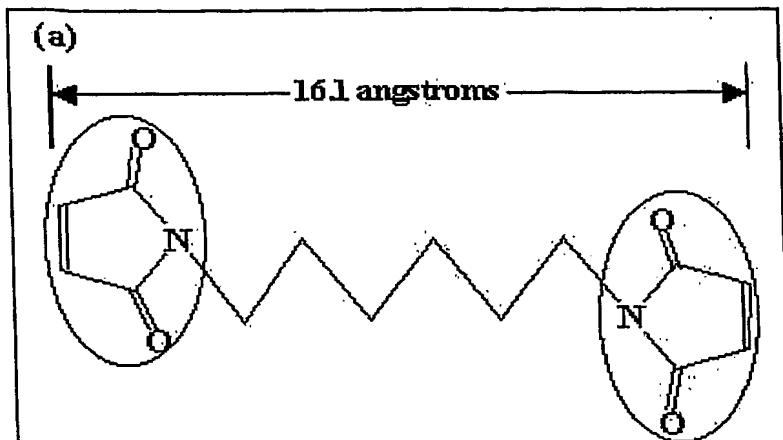
【도 9】



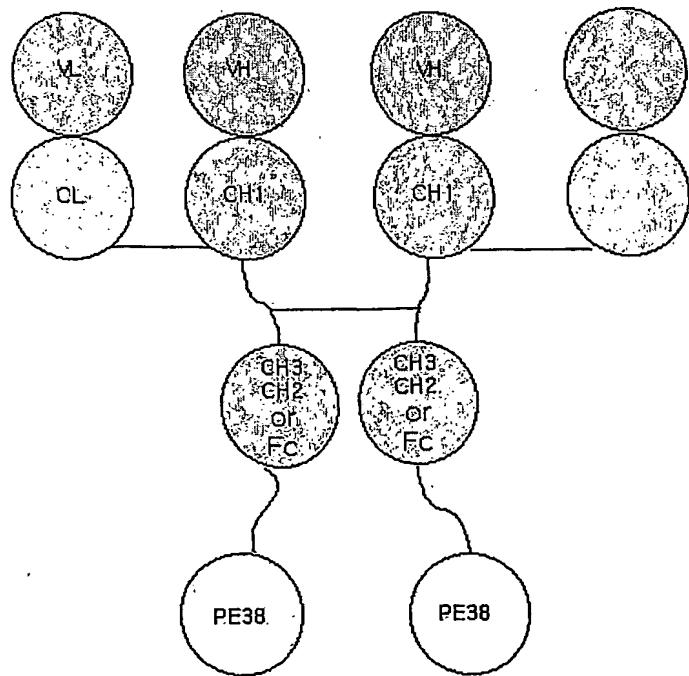
【도 10】



【도 11】

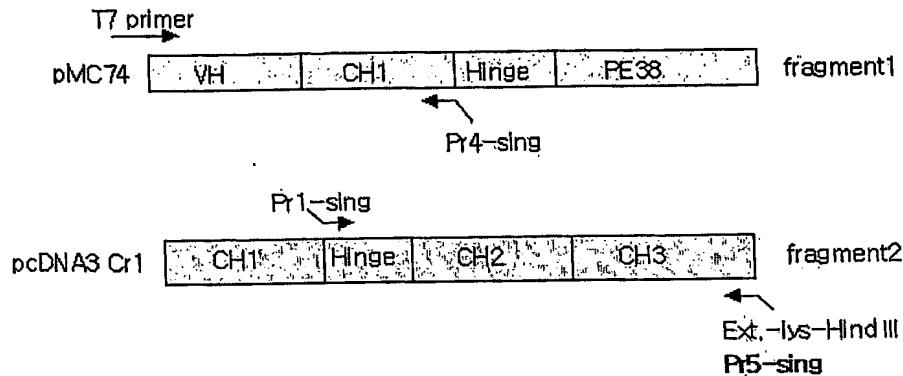


【도 12】

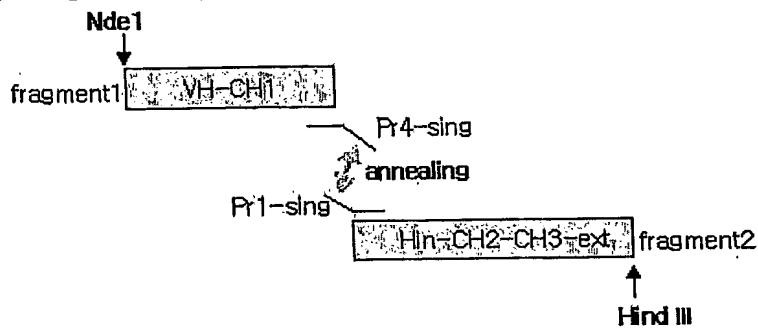


【도 13】

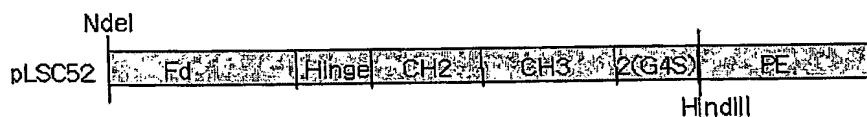
(a) Fd, Fc fragment PCR from pMC74 and pcDNA3C,1



(b) Splicing PCR amplification by overlap extension

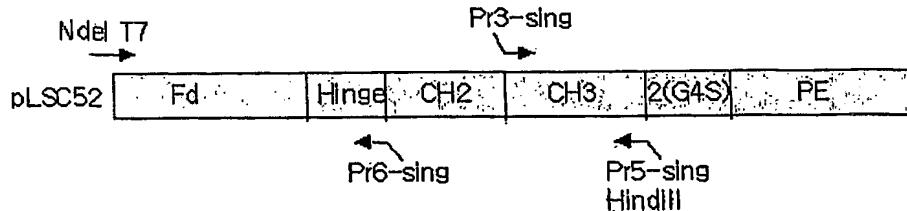


(c) Insert of pLSC52 encoding B3(Fd-Fc)-PE38R

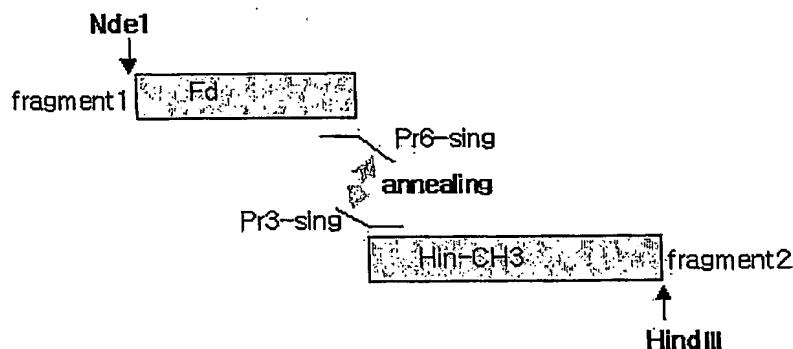


【도 14】

(a) Fd, CH3 fragment PCR from pLSC52



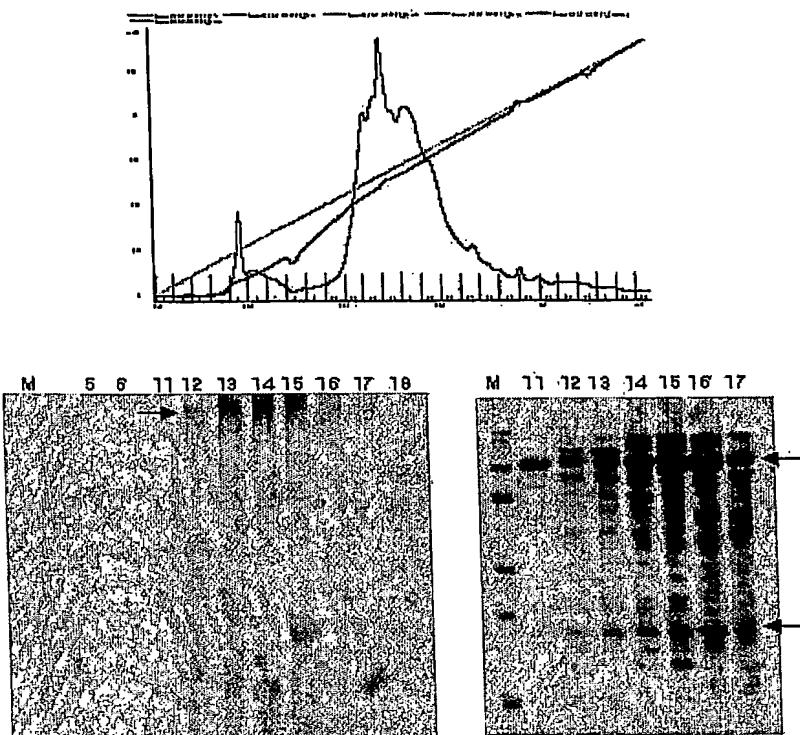
(b) Splicing PCR amplification by overlap extension



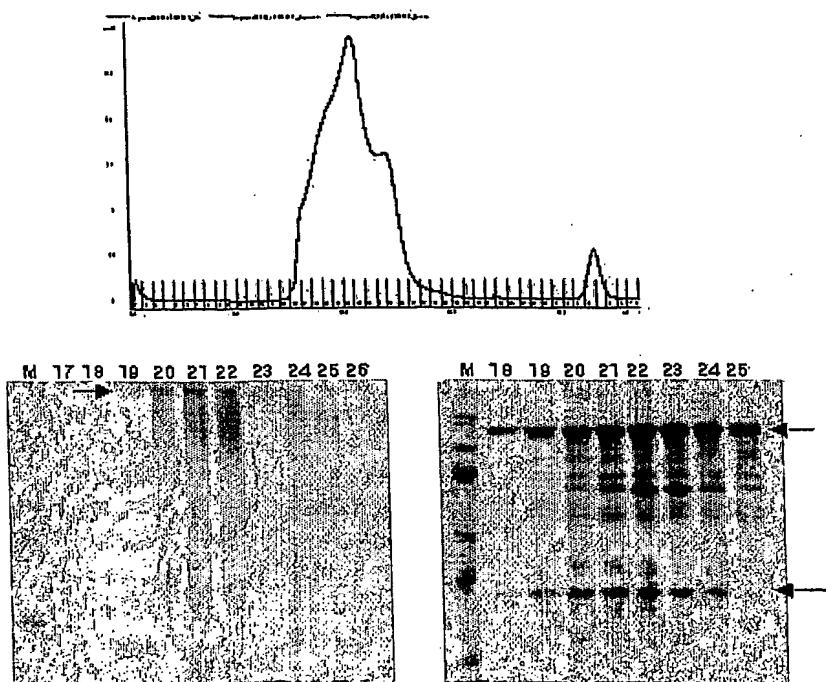
(c) Insert of pLSC32 encoding B3(Fd-CH3)-PE38R



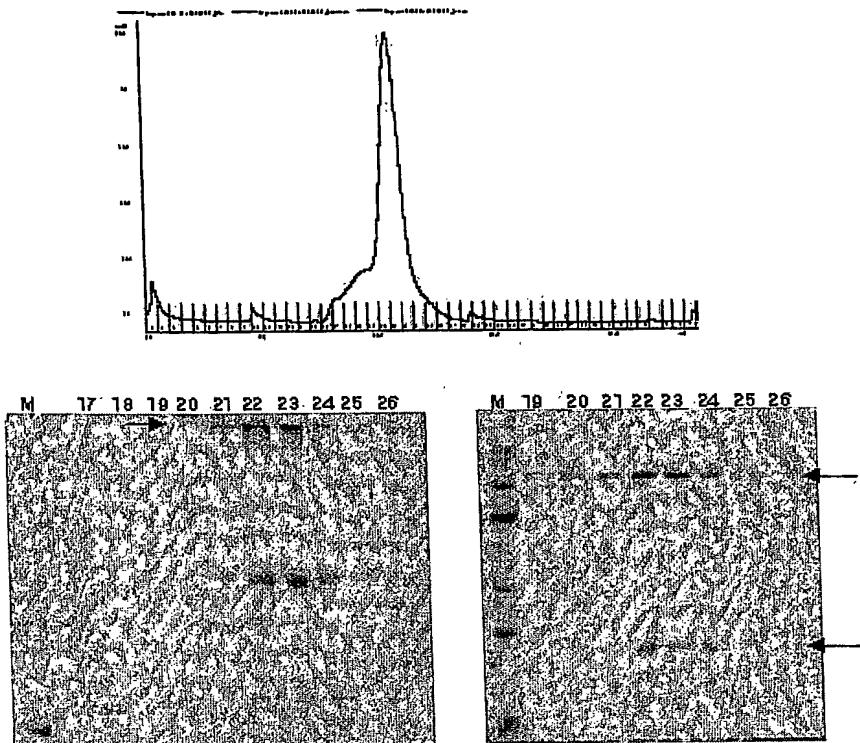
【도 15】



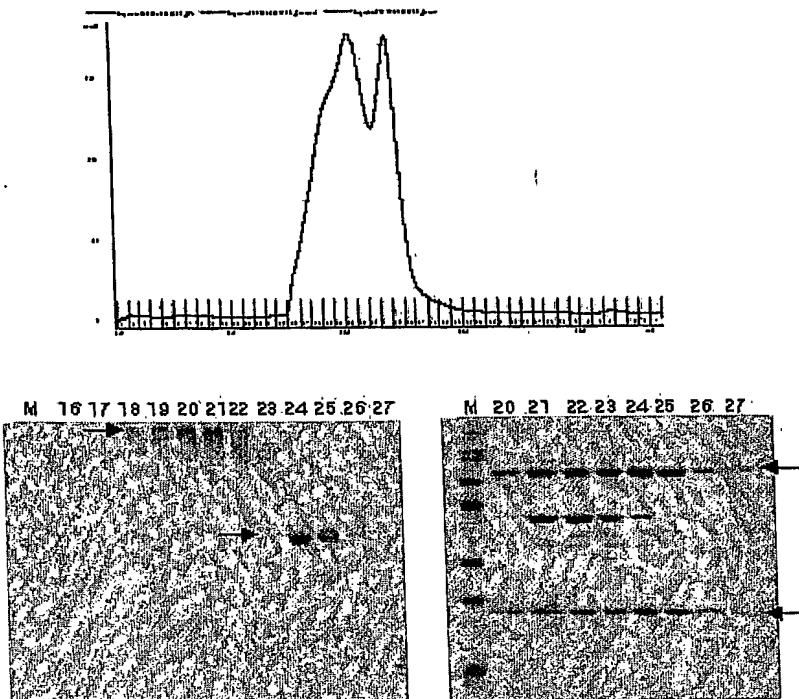
【도 16】



【도 17】



【도 18】



【서열목록】

<110> CHOE, MuHyeon <120> A Dimer of Chimeric Recombinant Binding
 Domain-Functional Group Fusion formed via Disulfide-bond-bridge and A Process
 For Producing The Same <160> 12 <170> Kopatent In 1.71 <210> 1 <211>
 1749 <212> DNA <213> pMC74 plasmid coding sequence <400> 1 atggatgtga
 agctgggtgga atctggagga ggcttagtgc agcctggagg gtcctgaaa 60 ctctcctgtg
 caacctctgg attcaacttgc agtgactatt acatgtattt ggttcggccag 120 actccagaga
 agaggctgga gtgggtcgca tacatttagta atgatgatag ttccggcgct 180 tattcagaca
 ctgtaaaggcccggttaccatctccagag acaatgccag gaacaccctc 240 tacctgcaaa
 tgagccgtct gaagtctgag gacacagcca tatattcctg tgcaagagga 300 ctggcctggg

gaggcctgggtt tgcttactgg ggccaaggga ctctggcac tgtctctgca	360 gccaaaacga
caccccccattc tgtctatcca ctggccctg gatctgctgc ccaaactaac	420 tccatggtga
ccctgggatg cctggtcaag ggctattcc ctgagccagt gacagtgacc	480 tggaactctg
gatccctgtc cagcggtgtg cacacccctcc cagctgtcct gcagtctgac	540 ctctacactc
tgagcagctc agtgactgtc ccctccagca cctggcccag cgagaccgtc	600 acctgcaacg
ttgcccaccc ggccagcagc accaagggtgg acaagaaaaat tgtgcccagg	660 gattgtggta
gttaagcctag cataagtaca aaagcttccg gaggtccgaa gggcggcagc	720 ctggccgcgc
tgaccgcgca ccaggcttgc cacctgccgc tggagacttt caccgtcat	780 cgccagccgc
gcggctggga acaactggag cagtgcggct atccggtgca gcggctggtc	840 gccctctacc
tggcggcgcg gctgtcggtt aaccaggatcg accaggtgat ccgcaacgccc	900 ctggccagcc
ccggcagcgg cggcgacctg ggcgaagcga tccgcgagca gccggagcag	960 gcccgtctgg
ccctgaccct ggccgcccggcc gagagcggc gcttcgtccg gcagggcacc	1020 ggcaacgacg
aggccggcgc ggccaaacggc cggcgacgaca gcggcgacgc cctgctggag	1080 cgcaactatc
ccactggcgc ggagttccctc ggcgacggcg ggcgacgtcag cttcagcacc	1140 cgccggcacgc
agaactggac ggtggagcgg ctgctccagg cgcaccgcca actggaggag	1200 cgccggctatg
tgttcgtcgg ctaccacggc accttcctcg aagcggcgca aagcatcgtc	1260 ttccggcgggg
tgcgcgcgcg cagccaggac ctgcacgcga tctggcgcgg tttctatatc	1320 gcccggcgtac
cggcgctggc ctacggctac gcccaggacc aggaacccga cgcacgcggc	1380 cgatccgca
acgggtccct gctgcgggtc tatgtgccgc gctcgagcct gccgggcttc	1440 taccgcacca
gcctgaccct ggccgcccgg gaggcggcgg gcgaggtcga acggctgatc	1500 ggccatccgc
tgccgctgcg cctggacgcc atcaccggcc ccgaggagga aggccggcgc	1560 ctggagacca

ttctcggtg gccgctggcc gagcgacccg tggtagttcc ctcggcgatc 1620 cccaccgacc
 cgcgcaacgt cggcgac ctcgaccgt ccagcatccc cgacaaggaa 1680 caggcgatca
 gcgccctgcc ggactacgcc agccagcccg gcaaaccgcc gcgcgaggac 1740 ctgaagtaa
 1749 <210> 2 <211> 1764 <212> DNA <213> pMH21 plasmid coding sequence <
 400> 2 atggaggtga agctgggtgga atctggagga ggcttagtgc agcctggagg gtccctgaaa
 60 ctctcctgtg caacctctgg attcactttc agtactattt acatgtattt gttcgccag 120
 actccagaga agaggctgga gtgggtcgca tacatttagta atgatgatag ttccgcccgt 180
 tattcagaca ctgtaaaggg ccggttcacc atctccagag acaatgccag gaacaccctc 240
 tacctgcaaa tgagccgtct gaagtctgag gacacagcca tatattcctg tgcaagagga 300
 ctggcctggg gagcctgggt tgcttactgg ggccaaggga ctctggtcac tgtctctgca 360
 gccaaaacga cacccttcatc tgtctatcca ctggccctg gatctgctgc ccaaactaac 420
 tccatggtga ccctggatg cctggtcaag ggctatttcc ctgagccagt gacagtgacc 480
 tggaactctg gatccctgtc cagcggtgtg cacaccccttcc cagctgtcct gcagttctgac 540
 ctctacactc tgagcagctc agtactgtc ccctccagca cctggccctg cgagaccgtc 600
 acctgcaacg ttgcccaccc ggccagcagc accaagggtgg acaagaaaat tgtgcccagg 660
 gattgtggta gtaagccttg cataagtaca aaagcttctg gtggtaggcgg atctggaggt 720
 cccgagggcg gcagcctggc cgcgtgacc ggcgcaccagg cttgccacct gccgctggag 780
 actttcaccc gtcatcgcca gcccggcggc tggaaacaac tggaggcagt cggttatccg 840
 gtgcagcggc tggtcgcctt ctacctggcg ggcgcggctgt cgtggaaacca ggtcgaccag 900
 gtgatccgca acgcccctggc cagccccggc agcggcggcg acctggcgaa agcgatccgc 960
 gagcagccgg agcaggcccg tctggccctg accctggcccg cccggagag cgagcgcttc 1020

gtccggcagg gcaccggcaa cgacgaggcc ggcgcggcca acggcccggc ggacagcggc 1080
 gacgcctgc tggagcgcaa ctatcccact ggcgcggagt tcctcggcga cggcggcgac 1140
 gtcagctca gcacccgcgg cacgcagaac tggacggtgg agcggctgct ccaggcgcac 1200
 cgccaaactgg aggagcgcgg ctatgtttc gtcggctacc acggcacctt cctcgaagcg 1260
 gcgcaaagca tcgtcttcgg cgggtgcgc ggcgcagcc aggacctcga cgcgatctgg 1320
 cgcggtttct atatcgccgg cgatccggcg ctggcctacg gctacgcccga ggaccaggaa 1380
 cccgacgcac gcccggat ccgcaacggt gccctgctgc gggtctatgt gccgcgctcg 1440
 agcctgccgg gcttctaccg caccagcctg accctggccg cgccggaggc ggcggcggag 1500
 gtcgaacggc tgcgtggcca tccgctggccg ctgcgcctgg acgccatcac cggccccgag 1560
 gaggaaggcg ggcgcctgga gaccatttc ggctggccgc tggccgagcg caccgtggtg 1620
 attccctcgg cgatccccac cgacccgcgc aacgtggcg ggcacctcga cccgtccagc 1680
 atccccgaca aggaacaggc gatcagcgcc ctgcccggact acgcccggcca gcccggcaaa 1740
 ccgcccgcgcg aggacctgaa gtaa 1764 <210>

3 <211> 1749 <212> DNA <213> pCE2 plasmid coding sequence <400> 3

atggatgtga agctgggtgga atctggagga ggcttagtgc agcctggagg gtccctgaaa 60
 ctctcctgtg caacctctgg attcactttc agtgaactatt acatgtattt ggttcggccag 120
 actccagaga agaggctgga gtgggtcgca tacattagta atgatgatag ttccggcgct 180
 tattcagaca ctgtaaaggc ccggttcacc atctccagag acaatggccag gaacaccctc 240
 tacctgcaaa tgagccgtct gaagtctgag gacacagcca tatattcctg tgcaagagga 300
 ctggcctggg gagcctgggt tgcttactgg ggccaaggga ctctggcac tgtctctgca 360
 gccaaaacga caccggatc tgtctatcca ctggccctg gatctgctgc ccaaactaac 420

tccatggta ccctggatg cctggtaag ggctattcc ctgagccagt gacagtgacc	480
tggaactctg gatccctgtc cagcggtgtg cacacccctcc cagctgtcct gcagtctgac	540
ctctacactc tgagcagctc agtgactgtc ccctccagca cctggcccag cgagaccgtc	600
acctgcaacg ttgcccaccc ggccagcagc accaagggtgg acaagaaaaat tgtgccagg	660
gattgtggta gtaagccttg cataagtaca aaagcttccg gaggtcccga gggcggcagc	720
ctggccgcgc tgaccgcga ccaggcttgc cacctgccgc tggagacttt caccgtcat	780
cggcagccgc gcccgtggga acaactggag cagtgcggct atccggtgca gcggctggc	840
gccctctacc tggcggcgcg gctgtcgtgg aaccaggtcg accaggtgat ccgcaacgcc	900
ctggccagcc ccggcagcgg cggcgacctg ggcgaagcga tccgcgagca gccggagcag	960
gcccgtctgg ccctgaccct ggccgcccgc gagagcggc gcttcgtccg gcagggcacc	1020
ggcaacgacg aggccggcgc ggccaacggc cggcggaca gcggcgacgc cctgctggag	1080
cgcaactatc ccactggcgc ggagttccctc ggcgacggcg gcgacgtcag cttagcacc	1140
cgccggcacgc agaactggac ggtggagcgg ctgctccagg cgcaccgcca actggaggag	1200
cgccggctatg tttcgctgg ctaccacggc accttcctcg aagcggcgca aagcatcgtc	1260
ttcggcgggg tgcgcgcg cagccaggac ctgcacgcga tctggcgcg tttctatatc	1320
gccggcgatc cggcgctggc ctacggctac gcccaggacc aggaacccga cgcacgcggc	1380
cggatccgca acgggtccct gctgcgggtc tatgtgccgc gctcgagcct gccgggcttc	1440
tacccacca gcctgaccct ggccgcgcgc gaggcggcgg gcgagggtcga acggctgatc	1500
ggccatccgc tgccgctgctg cctggacgcc atcaccggcc ccgaggagga aggcggcg	1560
ctggagacca ttctcggtcg gccgctggcc gagcgcacccg tggtgattcc ctcggcgatc	1620
cccaccgacc cgcgcaacgt cggcgacgc ctgcacccgt ccagcatccc cgacaaggaa	1680

caggcgatca gcgccctgcc ggactacgcc agccagcccg gcaaaccgcc gcgcgaggac 1740 ctgaagta
 1749 <210> 4 <211> 672 <212> DNA <213> pMC75 plasmid coding sequence
 <400> 4 atggatgtgc tcatgaccca gtcatttcattt agtttacctg tcagtcttgg agatcaagcc
 60 tccatctttt gcagatcttag tcagatcattt gtacatagta atggaaacac ctatttggaa 120
 tggtaacctgc agaaaccagg ccagtcctca aagtccttgc tctacaaagt ttccaaaccga 180
 ttttctgggg tccagacag gttcagtggc agtggatcag ggacagattt cacactcaag 240
 atcagcagag tggaggctga ggttctggga gtttattact gcttcaagg ttcacatgtt 300
 ccattcacgt tcggctcgaaa gacaaagtggaa gaaataaaac gggctgtatgc tgcaccaact 360
 gttatccatct tccaccatc cagtggcag ttaacatctt gagggtgcctc agtcgtgtgc 420
 ttcttgaaca acttctaccc caaagacatc aatgtcaagt ggaagattga tggcagtgaa 480
 cgacaaaaatg gcgtcctgaa cagttggact gatcaggaca gacaaagacag cacctacagc 540
 atgaggcagca ccctcacgtt gaccaaggac gatgtatgaaac gacataacag ctatacctgt 600
 . gaggccactc acaagacatc aacttccatcc attgtcaaga gcttcaacag gaatgagtg 660
 ggttaaagctt aa 672 <210>
 5 <211> 2454 <212> DNA <213> pLSC52 plasmid coding sequence <400> 5
 atggatgtga agctgggtgga atctggagga ggcttagtgc agcctggagg gtccctgaaa 60
 ctctcctgtt caacctctgg attcactttc agtgcattt acatgttattt ggttcggccag 120
 actccagaga agaggctgga gtgggtcgca tacatttagta atgtatgatag ttccggccgt 180
 tattcagaca ctgtaaaggg ccggttcacc atctccagag acaatgccag gaacaccctc 240
 tacctgcaaa tgagccgtct gaagtctgag gacacagcca tatattcctt tgcaagagga 300
 ctggcctggg gagcctggtt tgcttactgg ggcacaggaa ctctggtcac tgtctctgca 360

gccaaaacga cacccccatc tgtctatcca ctggccctg gatctgctgc ccaaactaac	420
tccatggta ccctggatg cctggtcaag ggctattcc ctgagccagt gacagtgacc	480
tggaactctg gatccctgtc cagcggtgtg cacacccccc cagctgtcct gcagtctgac	540
ctctacactc tgagcagctc agtgactgtc ccctccagca cctggcccaag cgagaccgtc	600
acctgcaacg ttgcccaccc ggccagcagc accaagggtgg acaagaaaat tgtgcccagg	660
gattgtggtg agccaaatc ttgtgacaaa actcacacat gcccaccgtg cccagcacct	720
gaactcctgg ggggaccgtc agtcttcctc ttccccccaa aacccaagga caccctcatg	780
atctcccgga cccctgaggt cacatgcgtg gtggtgacg tgagccacga agaccctgag	840
gtcaaggta actggtaacgt ggacggcgtg gaggtgcata atgccaagac aaagccgcgg	900
gaggagcagt acaacagcac gtaccgtgtg gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac	960
tggctgaatg gcaaggagta caagtgcag gtctccaaca aagccctccc agcccccata	1020
gagaaaaacca tctccaaagc caaagggcag ccccgagaac cacaggtgtac caccctgccc	1080
ccatcccggt atgagctgac caagaaccag gtcagcctga cctgcctggt caaaggcttc	1140
tatcccagcg acatcgccgt ggagtggag agcaatggc agccggagaa caactacaag	1200
accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc tccttcttcc tctacagcaa gtcaccgtg	1260
gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg	1320
cacaaccact acacgcagaa gagcctctcc ctgtctccgg gtaaaggcgg aggcggatcc	1380
ggtgtggcg gttctaaagc ttccggaggt cccgagggcg gcagcctggc cgcgctgacc	1440
gcgcaccagg ctgccaccc gccgctggag actttcaccc gtcatgcca gccgcgcggc	1500
tgggaacaac tggagcagtg cggttatccg gtgcagcggc tggtcgcctt ctacctggcg	1560
gcgcggctgt cgtggAACCA ggtcgaccag gtgatccgca acgcctggc cagccccggc	1620

agcggcggcg acctggcg a g c g a t c c g c g a g c a g c c g g a g c a g g c c c g t c t g g c c c t g	1680
accctggccg c c g c c g a g a g c g a g c t t c g t c g g c a g g g c a a c g a g g g c c	1740
g g c g c g g c c a c g g c c c g g c g g a c a g c g g c g a c g c c t g c t g g a g c g c a a c t a t c c a c t	1800
g g c g c g g a g t t c c t c g g c g a c g g c g a c g t t c a g c a c c g c g g c a c g c a g a a c	1860
t g g a c g g t g g a g c g g c t g c t c a g g c g c a c c g c a c t g g a g c g c g g c t a t g t g t t c	1920
g t c g g c t a c c a c g g c a c t t c t c a g g c a a g c a t g t c t t c g g c g g g g t g c g c	1980
g c g c g c a g c c a g g a c c t c g a c g a t c t g g c g g t t t c t a t c g c c g g c g a t c c g g c g	2040
c t g g c c t a c g g c a c c g c c c a g g a a c c g a c g c a c g c g g a t c c g c a a c g g t	2100
g c c c t g c t g c g g g t c t a t g t g c g c t c g a c c t g c c g g a t c c a c c g c t g c	2160
a c c c t g g c c g c g c g g a g g g c g g a c c t c g a a c c g c a c g c g g a t c c g c t g c c g	2220
c t g c g c t t g g a c c c a t c a c c g c c c g a g g a a g g c g g c c t t g g a a c c t t c t c	2280
g g c t g g c c g c t g g c a c c g t g g t g a t t c c t c g g c g a t c c c a c c g c g c a c c c g c g	2340
a a c g t c g g c g g c a c c g c a c t c g a c c g c a c t c c c a g a a c a c g g c g c a c g c c	2400
c t g c c g g a c t a c g c a g c c a g c c a a a c c g c g g c g g a g g a c c t g a a g t a a	2454 <210>
6 <211> 1233 <212> DNA <213> pKL4 plasmid coding sequence <400> 6	
a t g c a t c a c c a t c a c g a t g t g a a g c t g g t g g a a t c t g g a g g a g g c t t a g t g c a g	60
c c t g g a g g g t c c t g a a a c t c t c t g t g c a a c c t c t g g a t t c a c t t t c a g t g a c t a t t a c	120
a t g t a t t g g g t t c g c c a g a c t c c a g a a g a g g c t g g a g t g g t c g c a t a t t a a t	180
g a t g a t a g t t c c g c g c t t a a t c a g a c a c t g t a a a g g g g c c g t t c a c c a t c t c c a g a g a c	240
a a t g c c a g g a a c a c c c t c t a a t c t g c a a a t g g c g t c t g a g t c t g a g g a a c a c a g c c a t a	300
t a t t c c t g t g a a g g a g g a c t g c c t g g g g a g c t g g t t t g c t t a c t g g g g c a a g g g a c t	360

ctggtcactg tctctgcagc caaaacgaca ccccatctg tctatccact ggcccctgga	420
tctgctgccc aaactaactc catggtgacc ctgggatgcc tggtaaggg ctatccct	480
gagccagtga cagtgacactg gaactctgga tccctgtcca gcgggtgtgca caccttccca	540
gctgtcctgc agtctgaccc ctacactctg agcagctcag tgactgtccc ctccagcacc	600
tggcccagcg agaccgtcac ctgcaacgtt gcccacccgg ccagcagcac caaggtggac	660
aagaaaattg tgcccaggga ttgtggtgct aagcattgca tagtacaca agcttccggt	720
ggtggcggat ctggaggtgg cggaagcgga ggtcccgagg tgacaggggg aatggcaagc	780
aagtgggatc agaagggtat ggacattgcc tatgaggagg cggccttagg ttacaaagag	840
ggtgtgttc ctattggcgg atgtcttatac aataacaaag acggaagtgt tctcggtcgt	900
ggtcacaaca ttagatttca aaaggatcc gccacactac atggtgagat ctccactttg	960
aaaaactgtg ggagattaga gggcaaagtg tacaaagata ccacttgtac tacgacgctg	1020
tctccatgcg acatgtgtac aggtgccatc atcatgtatg gtattccacg ctgtgtgtc	1080
ggtgagaacg ttaatttcaa aagtaaggc gagaaatatt tacaaactag aggtcacgag	1140
gttgtgttg ttgacgtga gaggtgtaaa aagatcatga aacaatttat cgatgaaaga	1200
cctcaggatt ggttgaaga tattggtag tag	1233 <210>
7 <211> 4871 <212> DNA <213> pMC74 plasmid full sequence <400> 7	
taatacgact cactataggg agaccacaac ggttccctc tagaaataat ttgtttaac	60
ttaagaagg agatatacat atggatgtga agctggtgga atctggagga ggcttagtgc	120
agcctggagg gtccctgaaa ctctcctgtg caacctctgg attcactttc agtactatt	180
acatgtattt ggttcgcccag actccagaga agaggctgga gtgggtcgca tacatttagta	240
atgtatgtatg ttccggcgct tattcagaca ctgtaaaggg ccggttcacc atctccagag	300

acaatgccag gaacaccctc tacctgcaaa tgagccgtct gaagtctgag gacacagcca 360
tatattccctg tgcaagagga ctggcctggg gagcctggtt tgcttactgg ggccaaggga 420
ctctggtcac tgtctctgca gccaaaacga cacccccac tgtctatcca ctggccctg 480
gatctgctgc ccaaactaac tccatggtga ccctggatg cctggtcaag ggctatttcc 540
ctgagccagt gacagtgacc tggaactctg gatccctgtc cagcggtgtg cacacattcc 600
cagctgtcct gcagtctgac ctctacactc tgagcagctc agtactgtc ccctccagca 660
cctggccag cgagaccgtc acctgcaacg ttgcccaccc ggccagcagc accaagggtgg 720
acaagaaaat tgtgcccagg gattgtggta gtaagcctag cataagtaca aaagcttccg 780
gaggtcccga gggcggcagc ctggccgcgc tgaccgcga ccaggcttgc cacctgccgc 840
tggagacttt cacccgtcat cgccagccgc gcggctggga acaactggag cagtgcggct 900
atccggtgca gcggctggtc gccctctacc tggcggcgcgc gctgtcgtgg aaccaggtcg 960
accaggtgat ccgcaacgcc ctggccagcc ccggcagcgg cggcgcacctg ggcgaagcga 1020
tcccgagca gccggagcag gcccgcttgg ccctgaccct ggccgcccgc gagagcgagc 1080
gcttcgtccg gcagggcacc ggcaacgacg aggccggcgc ggccaaacggc ccggcggaca 1140
gcggcgcacgc cctgctggag cgcaactatc ccactggcgc gcagttcctc ggacgcggcg 1200
gcgacgtcag cttcagcacc cgccgcacgc agaactggac ggtggagcgg ctgctccagg 1260
cgcaccccca actggaggag cgccgcatacg tggcgcttcg ctaccacggc accttcctcg 1320
aagccggcga aagcatgtc ttccgggggg tgccgcgcgc cagccaggac ctgcacgcga 1380
tctggcgccgg ttctatatac gccggcgatc cggcgcttgc ctacggctac gcccaggacc 1440
aggaaccgcga cgacgcggc cggatccgca acgggtccct gctgcgggtc tatgtgccgc 1500
gctcgagcct gccgggcattc taccgcacca gcctgaccct ggccgcgcgg gagggcggcgg 1560

gcgagggtcga acggctgatc ggccatccgc tgccgctgcg cctggacgcc atcaccggcc 1620
ccgaggagga aggccccgcg ctggagacca ttctcggtcg gccgctggcc gagcgacccg 1680
tggtgattcc ctcggcgatc cccaccgacc cgcgcaacgt cgccggcgac ctcgaccgt 1740
ccagcatccc cgacaaggaa cagggatca gcgcctgcc ggactacgcc agccagcccg 1800
gcaaaccgcc gcgcgaggac ctgaagtaac tgccgcgacc ggccggctcc cttcgagga 1860
gcggcccttc tcggggccctg gccatacatc aggtttcct gatgccagcc caatcgaata 1920
tgaatcggc tgctaacaaa gcccggaaagg aagctgagtt ggctgctgcc accgctgagc 1980
aataactagc ataaccctt gggcctctaa acgggtcttgg aggggtttt tgctgaaagg 2040
aggaactata tccggatcgg agatcaattc tggcgtaata gcgaagaggg ccgcaccgat 2100
cgcccttccc aacagttcg tagcctgaat ggcgaatggg acgcgcctg tagccggcga 2160
ttaagcgcgg cgggtgtgg gttacgcgc acgtgaccg ctacacttgc cagccctta 2220
gcgcggctc cttcgctt cttcccttcc tttctgccca cgttcgccgg cttccctgt 2280
caagctctaa atcggggct ccctttaggg ttccgattta gtgcttacg gcacctcgac 2340
cccaaaaaac ttgatttaggg ttaggttca cgttagtggc catgcgcctg atagacggtt 2400
tttcgcctt tgacgttggc gtccacgttc tttaatagt gactcttggt ccaaactgg 2460
acaacactca accctatctc ggtctattct ttgatttt aaggattt gccgatttgc 2520
gcctattggtaaaaaatga gctgatttaa caaaaattta acgcaattt taacaaaata 2580
ttaacgttta caatttcagg tggcactttt cggggaaatg tgccggaaac ccctatttgt 2640
ttattttct aaatacattc aaatatgtat ccgctcatga gacaataacc ctgataaatg 2700
cttcaataat attgaaaaag gaagaggtatg agtattcaac attccgtgt cgcccttatt 2760
ccctttttgcggcatttgccttcgtt tttgctcacc cagaaacgt ggtgaaagta 2820

aaagatgctg aagatcagtt gggcacgat gtggttaca tcgaactgga tctcaacagc 2880
ggttaagatcc ttgagagttt tcgcggaa gaacgtttc caatgatgag cactttaaa 2940
gttctgctat gtggcggtt attatccgtt attgacgccc ggcaagagca actcggtcgc 3000
cgcatacact attctcagaa tgacttggtt gagtactcac cagtcacaga aaagcatctt 3060
acggatggca tgacagtaag agaattatgc agtgctgccaa taagcatgag tgataaacact 3120
gcggccaact tacttctgac aacgatcgga ggaccgaagg agctaaccgc ttttttcac 3180
aacatggggg atcatgtaac tcgccttgat cggtggaaac cgaggctgaa tgaagccata 3240
ccaaacgacg agcgtgacac cacgatgcct gtagcaatgg caacaacgtt gcgcaaacta 3300
ttaactggcg aactacttac tctagttcc cgccaacaat taatagactg gatggaggcg 3360
gataaaatgg caggaccact tctgcgctcg gcccttcgg ctggctggtt tattgctgat 3420
aaatctggag ccggtagcg tgggtctcg ggtatcattt cagcactggg gccagatgg 3480
aagccctccc gtatcgtagt tatctacacg acggcagtc aggcaactat ggttggaaacga 3540
aatagacaga tcgctgagat aggtgcctca ctgattaagc attggtaact gtcagaccaa 3600
gtttactcat atatacttta gattgattt aaacttcatt tttaattttaa aaggatctag 3660
gtgaagatcc ttgttataa tctcatgacc aaaatccctt aacgtgagtt ttctccac 3720
tgagcgtcag accccgtaga aaagatcaaa ggatcttctt gagatccctt tttctgcgc 3780
gtaatctgct gcttgcacaaac aaaaaacca ccgctaccag cggtggttt tttggccggat 3840
caagagctac caactctttt tccgaaggta actggcttca gcagagcgca gataccaaat 3900
actgtccttc tagttagcc gtagtttaggc caccacttca agaactctgt agcaccgcct 3960
acatacctcg ctctgctaat cctgttacca gtggctgctg ccagtggcga taagtctgt 4020
cttaccgggt tggactcaag acgatagttt ccggataagg cgccagcggtc gggctgaacg 4080

gggggttcgt gcacacagcc cagcttggag cgaacgacct acaccgaact gagataccta	4140
cagcgtgagc attgagaaag cgccacgctt cccgaaggga gaaaggcggc caggtatccg	4200
gtaagcggca gggtcggaac aggagagcgc acgagggagc ttccaggggg gaacgcctgg	4260
tatcttata gtcctgtcgg gtttcgccac ctctgacttg agcgtcgatt tttgtgatgc	4320
tcgtcagggg ggccgagcct atggaaaaac gccagcaacg cggcctttt acggttcctg	4380
gcctttgct ggcctttgc tcacatgttc tttcctgcgt tatcccctga ttctgtggat	4440
aaccgtatta ccgccttta gtgagctgat accgctcgcc gcagccgaac gaccgagcgc	4500
agcgagtcag tgagcgagga agcggaaagag cgcctgatgc ggtatttct cttacgcat	4560
ctgtcggtta tttcacacccg catatatggt gcactctcag tacaatctgc tctgatgccg	4620
catagttaa ccagtataca ctccgctatc gctacgtgac tgcaaggaga tggcgcccaa	4680
cagtcccccg gccacggggc ctgccaccat acccacgccc aaacaagcgc tcatgagccc	4740
gaagtggcga gcccgtatctt ccccatcggt gatgtcggcg atataggcgc cagcaaccgc	4800
acctgtggcg ccgggtgatgc cggccacgat gcgtccggcg tagaggatct tgagatctcg	4860
atcccgaaa t	4871 <210>

8 <211> 4886 <212> DNA <213> pMH21 plasmid full sequence <400> 8

taatacgact cactataggg agaccacaac ggtttccctc tagaaataat ttgtttaac	60
tttaagaagg agatatacat atggaggtga agctggtgga atctggagga ggcttagtgc	120
agcctggagg gtccctgaaa ctccctgtg caacctctgg attcactttc agtacttatt	180
acatgtattt ggttcgcccag actccagaga agaggctgga gtgggtcgca tacatttagta	240
atgatgatag ttccgcccgt tattcagaca ctgtaaaggg ccggttcacc atctccagag	300
acaatgccag gaacaccctc tacctgcaaa tgagccgtct gaagtctgag gacacagcca	360

tatattcctg tgcaagagga ctggcctggg gagcctggtt tgcttactgg ggccaaggga	420
ctctggtcac tgtctctgca gccaaaacga caccccccac tgtctatcca ctggccctg	480
gatctgctgc ccaaactaac tccatggtga ccctgggatg cctggtaag ggctatttc	540
ctgagccagt gacagtgacc tggaactctg gatccctgtc cagcggtgtg cacaccttcc	600
cagctgtcct gcagtctgac ctctacactc tgaggcagtc agtgactgtc ccctccagca	660
cctggcccgag cgagaccggtc acctgcaacg ttgcccaccc ggccagcagc accaagggtgg	720
acaagaaaaat tgtgcccagg gattgtggta gtaaggcttg cataagtaca aaagcttctg	780
gtggtggcgg atctggaggt cccgagggcg gcagcctggc cgcgctgacc ggcgcaccagg	840
cttgccacct gccgctggag actttcaccc gtcatcgcca gccgcgcggc tggaaacaac	900
tggagcagtg cggctatccg gtgcagcggc tggcgcctt ctacctggcg ggcgcggctgt	960
cgtggaacca ggtcgaccag gtgatccgca acgcccctggc cagccccggc agcggcggcg	1020
acctggcga agcgatccgc gagcagccgg agcaggcccg tctggccctg accctggccg	1080
ccgcccggag cgagcgcttc gtccggcagg gcaccggcaa cgacgaggcc ggcgcggcca	1140
acggcccgac ggacagcggc gacgccctgc tggagcgcaa ctatcccact ggcgcggagt	1200
tcctcggcga cggcggcgcac gtcagcttca gcacccggc cacgcagaac tggacggtgg	1260
agcggctgct ccaggcgcac cgccaaactgg aggagcggcgg ctatgtttc gtcggctacc	1320
acggcacctt cctcgaagcg ggcacaaagca tcgtcttcgg cgggggtgcgc ggcgcagcc	1380
aggacctcga cgcgatctgg cgcggttct atatgccgg cgatccggcg ctggcctacg	1440
gctacgcccga ggaccaggaa cccgacgcac gcccggat ccgcacggc gcccgtgc	1500
gggtctatgt ggcgcgcctcg agcctgcccgg gcttctaccg caccagcctg accctggccg	1560
cgccggaggc ggcggggcgag gtcgaacggc tgcgtggcca tccgctgccc ctgcgcctgg	1620

acgccatcac cgccccgag gaggaaggcg ggcgcctgga gaccattctc ggctggccgc 1680
tggccgagcg caccgtggtg attccctcg cgatccccac cgaccgcgc aacgtcggcg 1740
gcgacctcga cccgtccagc atccccgaca aggaacaggc gatcagcgcc ctgccggact 1800
acgccagcca gcccggcaaa ccgcccgcgc aggacctgaa gtaactgccg cgaccggccg 1860
gctcccttcg caggagccgg ctttcgccc gcctggccat acatcagggtt ttccctgatgc 1920
cagcccaatc gaatatgaat tcggctgcta acaaagcccg aaaggaagct gagttggctg 1980
ctgccaccgc tgagcaataa ctagcataac cccttgggcc tctaaacggg tcttgagggg 2040
tttttgctg aaaggaggaa ctatatccgg atcggagatc aattctggcg taatagcgaa 2100
gaggcccgca ccgatcgccc ttcccaacag ttgcgtagcc tgaatggcga atggacgcg 2160
ccctgtagcg gcgcattaag cgcggcggt gtgggttta cgccgcgcgt gaccgctaca 2220
cttgcacgcg ccctagcgcc cgctccccc gctttctcc cttccccc cggccacgttc 2280
gccggcttc cccgtcaagc tctaaatcgg gggctccctt tagggttccg atttagtgc 2340
ttacggcacc tcgaccccaa aaaacttgat tagggtgatg gttcacgtag tggccatcg 2400
ccctgataga cggttttcg cccttgacg ttggagtcca cgttctttaa tagtggactc 2460
ttgttccaaa ctggaacaac actcaaccct atctcggtct attctttga ttataaggg 2520
atttgccga ttccggccta ttggtaaaa aatgagctga tttaacaaaa attaacgcg 2580
aatttaaca aaatattaac gtttacaatt tcagggtggca ctttcgggg aatgtgcgc 2640
ggAACCCCTA TTTGTTATT TTTCTAAATA CATTCAAATA TGTATCCGCT CATGAGACAA 2700
taaccctgat aaatgcttca ataatattga aaaaggaaga gtatgagtat tcaacatttc 2760
cgtgtcgccc ttattccctt tttgcggca tttgccttc ctgttttgc tcacccagaa 2820
acgctggtga aagtaaaaga tgctgaagat cagttgggtg cacgagtggg ttacatcgaa 2880

ctggatctca acagcgtaa gatcctgag agtttcgcc ccgaagaacg tttccaatg	2940
atgagcactt ttaaagttct gctatgtggc gcggattat cccgtattga cgccggcaa	3000
gagcaactcg gtcgcccgt acactattct cagaatgact tggtagtgc ctcaccagtc	3060
acagaaaagc atcttacgga tggcatgaca gtaagagaat tatgcagtgc tgccataagc	3120
atgagtata acactgcggc caacttactt ctgacaacga tcggaggacc gaaggagcta	3180
accgctttt ttcacaacat ggggatcat gtaactcgcc ttgatcggt ggaaccggag	3240
ctgaatgaag ccataccaaa cgacgagcgt gacaccacga tgccgttagc aatggcaaca	3300
acgttgcgca aactattaac tggcgaacta cttactctag cttccggca acaattaata	3360
gactggatgg aggccgataa agttgcagga ccacttgc gctcgccct tccggctggc	3420
tggtttattt ctgataaaatc tggagccggt gagcgtgggt ctcgcgtat cattgcagca	3480
ctggggccag atggtaagcc ctcccgatc gtagttatct acacgacggg cagtcaggca	3540
actatggatg aacgaaatag acagatcgct gagataggtg cctcaactgat taagcattgg	3600
taactgtcag accaagttt ctcataata ctttagattt attaaaact tcattttaa	3660
tttaaaagga tcttaggtgaa gatcctttt gataatctca tgacccaaat cccttaacgt	3720
gagtttcgt tccactgagc gtcagacccc gtagaaaaaga tcaaaggatc ttcttgagat	3780
ccttttttc tgcgctaat ctgctgctt gaaacaaaaa aaccaccgtt accagcggtt	3840
gtttgttgc cgatcaaga gctaccaact cttttccga aggtactgg ctgcagcaga	3900
gcgcagatac caaatactgt cttcttagt tagccgtat taggccacca cttcaagaac	3960
tctgttagcac cgccctacata cctcgatctg ctaatcctgt taccagtggc tgctgccagt	4020
ggcgataagt cgtgtttac cgggttggac tcaagacgt agttaccgga taaggcgcag	4080
cggtcgggct gaacggggggg ttctgtgcaca cagccagct tggagcgaac gacctacacc	4140

gaactgagat acctacagcg tgagcattga gaaagcgcca cgcttcccga agggagaaaag 4200
 gcggacaggt atccggttaag cggcagggtc ggaacaggag agcgcacgag ggagcttcca 4260
 ggggggaacg cctggtatct ttatagtcct gtcgggttc gccacctctg acttgagcgt 4320
 cgattttgt gatgctcgtc aggggggcccg agcctatgga aaaacgccag caacgccc 4380
 ttttacggt tcctggcctt ttgctggcct tttgctcaca ttttcttcc tgcgttatcc 4440
 cctgattctg tggataaccg tattaccgcc tttgagttagt ctgataccgc tcgcccgc 4500
 cgaacgaccg agcgcagcga gtcagtggc gaggaagcgg aagagcgcct gatgcgttat 4560
 tttctcccta cgcattctgtc cggtatttca caccgcata atggtgact ctcagtacaa 4620
 tctgctctga tgccgcata gttaaagccagt atacactccg ctatcgctac gtgactgcaa 4680
 ggagatggcg cccaaacagtc ccccgccac ggggcctgcc accataccca cgccgaaaca 4740
 agcgctcatg agcccgaagt ggcgagcccg atcttccca tcggtgatgt cggcgatata 4800
 ggcgccagca accgcacccgt tggcgccggt gatgccggcc acgatgcgtc cggcgtagag 4860
 gatcttgaga tctcgatccg cgaaat 4886 <210>

9 <211> 4871 <212> DNA <213> pCE2 plasmid full sequence <400> 9

taatacgact cactataggg agaccacaac gttttccctc tagaaataat tttgttaac 60
 tttaagaagg agatatacat atggatgtga agctggtgga atctggagga ggcttagtgc 120
 agcctggagg gtccctgaaa ctctcctgtc caacctctgg attcacttcc agtgcattt 180
 acatgtattt ggttcggccag actccagaga agaggctgga gtgggtcgca tacatttaga 240
 atgatgatag ttccggccct tattcagaca ctgtaaaggg ccggttcacc atctccagag 300
 acaatgccag gaacaccctc tacctgcaaa tgagccgtct gaagtctgag gacacagcc 360
 tatattccctg tgcaagagga ctggcctggg gaggctgggt tgcttactgg ggccaaggga 420

ctctggtcac tgtctctgca gccaaaacga cacccccac tgtctatcca ctggccctg	480
gatctgctgc ccaaactaac tccatggtga ccctggatg cctggtcaag ggctattcc	540
ctgagccagt gacagtgacc tggaactctg gatccctgtc cagcggtgtg cacaccttcc	600
cagctgtcct gcagtctgac ctctacactc tgagcagctc agtactgtc ccctccagca	660
cctggccca cgagaccgtc acctgcaacg ttgcccaccc ggccagcagc accaagggtgg	720
acaagaaaat tgtgcccagg gattgtggta gtaagccttg cataagtaca aaagcttccg	780
gaggtcccga gggcggcagc ctggccgcgc tgaccgcga ccaggcttgc cacctgccgc	840
tggagacttt cacccgtcat cgccagccgc gcggctggga acaactggag cagtgcggct	900
atccggtgca gcggctggtc gccctctacc tggcggcgcg gctgtcgtgg aaccaggtcg	960
accaggtgat ccgcaacgcc ctggccagcc ccggcagcgg cggcgacctg ggcgaagcga	1020
tccgcgagca gccggagcag gcccgtctgg ccctgaccct ggccgcccgc gagagcggc	1080
gcttcgtccg gcagggcacc ggcaacgcacg aggccggcgc ggccaacggc ccggcggaca	1140
gcggcgacgc cctgctggag cgcaactatc ccactggcgc ggagttcctc ggacggcgc	1200
gcgacgtcag cttcagcacc cgcggcacgc agaactggac ggtggagcgg ctgctccagg	1260
cgcaccgcca actggaggag cgcggctatg ttttcgtcgg ctaccacggc accttcctcg	1320
aagcggcgca aagcatcgtc ttccgggggg tgccgcgcgc cagccaggac ctgcacgcga	1380
tctggcgcgg tttctatatac gccggcgatc cggcgctggc ctacggctac gcccaggacc	1440
aggaacccga cgcacgcggc cggatccgca acgggtccct gctgcgggtc tatgtgccgc	1500
gctcgagcct gccgggcttc taccgcacca gcctgaccct ggccgcgcgc gaggcggcgg	1560
gcgaggtcga acggctgatc ggccatccgc tgccgcgtcg cctggacgcc atcaccggcc	1620
ccgaggagga aggccggcgc ctggagacca ttctcggctg gccgctggcc gagcgcaccg	1680

tggtgattcc	ctcgcgatc	cccaccgacc	cgcgcaacgt	cggcgccgac	ctcgaccgt	1740
ccagcatccc	cgacaaggaa	caggcgatca	gcccctgcc	ggactacgcc	agccagcccg	1800
gcaaaccgcc	gcgcgaggac	ctgaagtaac	tgccgcgacc	ggccggctcc	cttcgcagga	1860
gccggcccttc	tcggggcctg	gccatacatac	aggttttcct	gatgccagcc	caatcgaata	1920
tgaattcggc	tgctaacaaaa	gcccgaaagg	aagctgagtt	ggctgctgcc	accgctgagc	1980
aataactagc	ataaccctt	gggcctctaa	acgggtcttg	aggggtttt	tgctgaaagg	2040
aggaactata	tccggatcg	agatcaattc	tggcgtata	gcgaagaggc	ccgcaccgat	2100
cgccttccc	aacagttgcg	tagcctgaat	ggcgaatggg	acgcgcctg	tagcggcgca	2160
ttaagcgcgg	cgggtgtgg	ggttacgcgc	agcgtgaccg	ctacacttgc	cagcgcctta	2220
gcgcggctc	cttcgcctt	cttccttcc	tttctcgcca	cgttcgcgg	ctttccccgt	2280
caagctctaa	atcggggct	ccctttaggg	ttccgattta	gtgcttacg	gcacctcgac	2340
cccaaaaaac	ttgatttaggg	tgatggttca	cgtagtggc	catgcgcctg	atagacggtt	2400
tttcgcctt	tgacgttgga	gtccacgttc	ttaatagt	gactttgtt	ccaaactgga	2460
acaacactca	accctatctc	ggtctattct	tttgcattat	aaggatttt	gccgatttcg	2520
gcctattgg	taaaaaatga	gctgattaa	caaaaattt	acgcgaattt	taacaaaata	2580
ttaacgttta	caatttcagg	tggcactttt	cggggaaatg	tgcgcgaaac	ccctatttgt	2640
ttattttct	aaatacattc	aaatatgtat	ccgctcatga	gacaataacc	ctgataaatg	2700
cttcaataat	attgaaaaag	gaagagtgatg	agtattcaac	atttccgtgt	cgccttatt	2760
cccttttttg	cggcattttg	cttcctgtt	tttgcacc	cagaaacgct	ggtgaaagta	2820
aaagatgctg	aagatcagtt	gggtgcacga	gtgggttaca	tcgaactgga	tctcaacagc	2880
ggtaagatcc	ttgagagttt	tcgccccgaa	gaacgttttc	caatgatgag	cactttaaa	2940

gttctgctat gtggcgccgt attatccgtt attgacgcccggcaagagca actcggtcgcc 3000
cgccatacact attctcagaa tgacttggtt gagtactcac cagtcacaga aaagcatctt 3060
acggatggca tgacagtaag agaattatgc agtgctgccat taagcatgag tgataacact 3120
gcggccaaact tacttctgac aacgatcgga ggaccgaagg agctaaccgc ttttttac 3180
aacatggggg atcatgtaac tcgccttgat cggtggaaac cggagctgaa tgaagccata 3240
ccaaacgacg agcgtgacac cacgatgcct gtagcaatgg caacaacgtt gcgcaaacta 3300
ttaactggcg aactactiac tctagttcc cgccaacaat taatagactg gatggaggcg 3360
gataaagtgc caggaccact tctgcgctcg gcccttcgg ctggctggtt tattgctgat 3420
aaatctggag ccgggtgagcg tgggtctcgc ggtatcattt cagcactggg gccagatgg 3480
aagccctccc gtatcgtagt tatctacacg acgggcagtc aggcaactat ggtatgaacga 3540
aatagacaga tcgctgagat aggtgcctca ctgattaagc attggtaact gtcagaccaa 3600
gtttactcat atatacttta gattgatttta aaacttcattt tttttaattaa aaggatctag 3660
gtgaagatcc ttttgataa tctcatgacc aaaatccctt aacgtgagtt ttgcgttccac 3720
tgagcgtcag accccgtaga aaagatcaaa ggatcttctt gagatcctt tttctgcgc 3780
gtaatctgct gcttgcaaac aaaaaaaacca ccgctaccag cgggtggtttgc tttgccggat 3840
caagagctac caactcttt tccgaaggta actggcttca gcagagcgca gataccaaat 3900
actgtccttc tagttagcc gtagttaggc caccacttca agaactctgt agcaccgcct 3960
acataacctcg ctctgctaattt cctgttacca gtggctgctg ccagtggcgtaa taagtctgt 4020
cttaccgggt tggactcaag acgatagttt ccggataagg cgcagcggtc gggctgaacg 4080
gggggttcgt gcacacagcc cagcttggag cgaacgacctt acaccgaactt gagataccta 4140
cagcgtgagc attgagaaag cgccacgctt cccgaaggtaa gaaaggcgga caggtatccg 4200

gtaagcggca gggtcggaac aggagagcgc acgagggagc ttccaggggg gaacgcctgg	4260
tatcttata gtcctgtcgg gtttcgccac ctctgacttg agcgtcgatt tttgtgatgc	4320
tcgtcagggg ggccgagcct atggaaaaac gccagcaacg cggcctttt acggttcctg	4380
gcctttgct ggcctttgc tcacatgttc ttccctgcgt tatcccctga ttctgtggat	4440
aaccgtatta ccgccttga gtgagctgat accgctcgcc gcagccgaac gaccgagcgc	4500
agcgagttag tgagcgagga agcggaaagag cgcctgatgc ggtattttct cttacgcat	4560
ctgtgcggta ttacacccg catatatggt gcactctcag tacaatctgc tctgatgccg	4620
catagttaaag ccagtataca ctccgctatc gctacgtgac tgcaaggaga tggcgccaa	4680
cagtcccccg gccacggggc ctgccaccat acccacgccc aaacaagcgc tcatgagccc	4740
gaagtggcga gcccgtatctt cccatcggt gatgtcggcg atataggcgc cagcaaccgc	4800
acctgtggcg ccggtgatgc cggccacgat gcgtccggcg tagaggatct tgagatctcg	4860
atcccgaaaa t	4871 <210>

10 <211> 3703 <212> DNA <213> pMC75 plasmid full sequence <400> 10	
taatacgact cactataggg agaccacaac ggtttccctc tagaaataat tttgtttaac	60
ttaagaagg agatatacat atggatgtgc tcatgaccca gtctccattt agtttacctg	120
tcatgtttgg agatcaagcc tccatctttt gcagatcttgc tcagatcattt gtacatagta	180
atggaaacac ctatttagaa tggtaacctgc agaaaccagg ccagtctcca aagctcctga	240
tctacaaagt ttccaaaccga ttttctgggg tccagacag gttcagtggc agtggatcag	300
ggacagattt cacactcaag atcagcagag tggaggctga ggatctggga gtttattact	360
gctttcaagg ttcacatgtt ccattcacgt tcggctcggtt gacaaagtggaa gaaataaaac	420
gggctgtatgc tgcaccaact gtatccatct tcccaccatc cagtgagcag ttaacatctg	480

gagggtgcctc agtcgtgtgc ttcttgaaca acttctaccc caaagacatc aatgtcaagt	540
ggaagattga tggcagtgaa cgacaaaatg gcgtcctgaa cagttggact gatcaggaca	600
gcaaagacag cacctacagc atgaggcagca ccctcacgtt gaccaaggac gagttatgaac	660
gacataacag ctatacctgt gaggccactc acaagacatc aacttcaccc attgtcaaga	720
gcttcaacag gaatgagtgt ggttaagctt aatgaattcg gctgctaaca aagcccgaaa	780
ggaagctgag ttggctgctg ccaccgctga gcaataacta gcataacccc ttgggcctct	840
aaacgggtct ttaggggaaa ttgcgtgaaa ggaggaacta tatccggatc ggagatcaat	900
tctggcgtaa tagcgaagag gcccgcaccc atcgcccttc ccaacagttt cgtagcctga	960
atggcgaatg ggacgcgccc tgttagcggcg cattaagcgc ggcgggtgtg gtggttacgc	1020
gcagcgtgac cgctacactt gccagcgccc tagcgccgc tcctttcgct ttcttcctt	1080
cctttctcgc cacgttcgcc ggctttcccc gtcaagctct aaatcggggg ctccctttag	1140
ggttccgatt tagtgctta cggcacctcg accccaaaaa acttgattag ggtgatggtt	1200
cacgtagtgg gccatcgccc tgatagacgg ttttcgccc ttgacgttg gagtccacgt	1260
tcttaatag tggactcttg ttccaaactg gaacaacact caaccctatc tcggctatt	1320
cttttgcattt ataagggatt ttgccgattt cggcctattt gttaaaaaat gagctgattt	1380
aacaaaaatt taacgcgaat tttaacaaaa tattaacgtt tacaatttca ggtggcactt	1440
ttcggggaaa tgtgcgcgga acccctattt gtttattttt ctaaatatcat tcaaataatgt	1500
atccgctcat gagacaataa ccctgataaa tgcttcaata atattgaaaa aggaagagta	1560
tgagtttca acatttcgt gtcgcctta ttccctttt tgccgcatt tgccttcctg	1620
tttttgctca cccagaaaacg ctggtgaaag taaaagatgc tgaagatcag ttgggtgcac	1680
gagtgggtta catcgaactg gatctcaaca gcggtaagat ctttgagagt ttgcggcccg	1740

aagaacgtt tccaatgatg agcactttt aagttctgct atgtggcgcg gtattatccc	1800
gtattgacgc cgggcaagag caactcggtc gccgcataca ctattcttag aatgacttgg	1860
ttgagtagtc accagtcaca gaaaagcatc ttacggatgg catgacagta agagaattat	1920
gcagtgcgtc cataaggatg agtgataaca ctgcggccaa cttacttctg acaacgatcg	1980
gaggaccgaa ggagctaacc gcttttttc acaacatggg ggatcatgt aactcgccctt	2040
atcggtggga accggagctg aatgaagcca taccaaacga cgagcgtgac accacgatgc	2100
ctgttagcaat ggcaacaacg ttgcgcacaa tattaaactgg cgaactactt actctagctt	2160
cccgcaaca attaatagac tggatggagg cggtataagt tgcaggacca cttctgcgt	2220
cggcccttcc ggctggctgg ttattgtcg ataaatctgg agccggtagg cgtgggtctc	2280
cggtatcat tgcagcaactg gggccagatg gtaagccctc ccgtatcgta gttatctaca	2340
cgacgggcag tcaggcaact atggatgaac gaaatagaca gatcgctgag ataggcct	2400
cactgattaa gcattggtaa ctgtcagacc aagttactc atataactt tagattgatt	2460
taaaacttca ttttaattt aaaaggatct aggtgaagat ccttttgat aatctcatga	2520
ccaaaatccc ttaacgtgag tttcgttcc actgagcgtc agaccccgta gaaaagatca	2580
aaggatctt ttagatcct tttttctgc gcgtaatctg ctgcttgcaa aaaaaaaaaac	2640
caccgctacc agcggtggtt tggttgcgg atcaagagct accaactctt tttccgaagg	2700
taactggctt cagcagagcg cagataccaa atactgtcct tcttagttag ccgtatgttgc	2760
gccaccactt caagaactct gtagcaccgc ctacataacct cgctctgcta atcctgttac	2820
cagtggctgc tgccagtgcc gataagtcgt gtcttaccgg gttggactca agacgatagt	2880
taccggataa ggcgcagcgg tcgggctgaa cgggggttc gtgcacacag cccagcttgg	2940
agcgaacgac ctacaccgaa ctgagatacc tacagcgtga gcattgagaa agcgcacgc	3000

ttcccgaagg gagaaaggcg gacaggtatc cggttaagcgg cagggtcgga acaggagagc	3060
gcacgaggga gcttccaggg gggAACgcct ggtatctta tagtcctgtc gggtttcgccc	3120
acctctgact tgacggtcga tttttgtat gctcggtcagg gggccgagc ctatggaaaa	3180
acgccagcaa cgccgcctt ttacggttcc tggcctttt ctggcctttt gctcacatgt	3240
tcttcctgc gttatcccct gattctgtgg ataaccgtat taccgcctt gagtgagctg	3300
ataccgctcg ccgcagccga acgaccgagc gcagcgagtc agtgagcgag gaagcggaaag	3360
agcgcctgtat gcggtatttt ctccttacgc atctgtgcgg tatttcacac cgcatatatatg	3420
gtgcactctc agtacaatct gctctgtatgc cgcatagttt agccagtata cactccgcta	3480
tcgctacgtg actgcaagga gatggcgccc aacagtcccc cggccacggg gcctgccacc	3540
atacccacgc cgaaacaaggc gctcatgagc ccgaagtggc gagcccgatc ttccccatcg	3600
gtgatgtcgg cgatataggc gccagcaacc gcacctgtgg cgccgggtat gcccggccacg	3660
atgcgtccgg cgttagaggat cttgagatct cgatccgcga aat	3703 <210>
11 <211> 5576 <212> DNA <213> pLSC52 plasmid full sequence <400> 11	
taatacgtact cactataggg agaccacaac ggtttccctc tagaaataat tttgttaaac	60
tttaagaagg agatatacat atggatgtga agctggtgga atctggagga ggcttagtgc	120
agcctggagg gtccctgaaa ctctcctgtg caacctctgg attcacatcc agtgactatt	180
acatgtattt gggtcgccag actccagaga agaggctgga gtgggtcgca tacatttagta	240
atgatgatag ttccggccgt tattcagaca ctgtaaaggg ccggttcacc atctccagag	300
acaatgccag gaacaccctc tacctgcaaa tgagccgtct gaagtctgag gacacagcca	360
tatattcctg tgcaagagga ctggcctggg gagcctgggt tgcttactgg ggccaaggga	420
ctctggtcac tgtctctgca gccaacaaacga caccatccatc tgtctatcca ctggccctg	480

gatctgctgc ccaaactaac tccatggta ccctggatg cctggtaag ggctattcc	540
ctgagccagt gacagtgacc tggaactctg gatccctgac cagcggtgtg cacacccatcc	600
cagctgtcct gcagtctgac ctctacactc tgaggcagtc agtgactgac ccctccagca	660
cctggcccgag cgagaccgtc acctgcaacg ttggccaccc ggccagcagc accaagggtgg	720
acaagaaaat tgtgccagg gattgtggtg agccaaatc ttgtgacaaa actcacacat	780
gcccaccgtg cccagcacct gaactcctgg ggggaccgtc agtcttcctc ttccccccaa	840
aacccaagga caccctcatg atctcccgga cccctgaggt cacatgcgtg gtggtgacg	900
tgagccacga agaccctgag gtcaagttca actggtagt ggacggcgtg gaggtgcata	960
atgccaagac aaagccgcgg gaggaggagt acaacagcac gtaccgtgtg gtcaagcgtcc	1020
tcaccgtcct gcaccaggac tggctgaatg gcaaggagta caagtgcac gtctccaaca	1080
aagccctccc agccccatc gagaaaacca tctccaaagc caaaggcag ccccgagaac	1140
cacaggtgta caccctgccc ccatccggg atgagctgac caagaaccag gtcagcctga	1200
cctgcctggt caaaggcttc tatcccgacg acatcgccgt ggagtggag agcaatggc	1260
agccggagaa caactacaag accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc tccttcttcc	1320
tctacagcaa gctcaccgtg gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc ttctcatgct	1380
ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacgcagaa gagcctctcc ctgtctccgg	1440
gtaaaggcgg aggcggatcc ggtggtgccg gttctaaagc ttccggaggt cccgagggcgc	1500
gcagcctggc cgccgtgacc ggcgcaccagg cttgccaccc ggcgcgtggag actttcaccc	1560
gtcatcgcca ggcgcgcggc tggaaacaac tggagcagtg cggctatccg gtgcagcggc	1620
tggtcgcccct ctacctggcg gcgcggctgt cgtgaaacca ggtcgaccag gtgatccgca	1680
acgcctggc cagccccggc agcggcggcg acctggcga agcgatccgc gagcagccgg	1740

agcaggcccg tctggccctg accctggccg ccgcccggagag cgagcgcttc gtccggcagg	1800
gcaccggcaa cgacgaggcc ggcgcggcca acggcccggc ggacagcggc gacgccctgc	1860
tggagcgcaa ctatcccact ggcgcggagt tcctcggcga cggcggcgac gtcagcttca	1920
gcacccgcgg cacgcagaac tggacggtgg agcggctgct ccaggcgcac cgccaactgg	1980
aggagcgcgg ctatgtgttc gtcggctacc acggcacctt cctcgaagcg gcgcaaagca	2040
tcgtcttcgg cgggtgcgc ggcgcagcc aggacctcga cgcatctgg cgcggttct	2100
atatcgccgg cgatccggcg ctggcctacg gctacgcccc ggaccaggaa cccgacgcac	2160
gcggccggat ccgcaacggt gccctgctgc gggtctatgt gccgcgctcg agcctgccgg	2220
gcttctaccg caccagcctg accctggccg cgccggaggc ggcggcgag gtcgaacggc	2280
tgatcgccca tccgctgccc ctgcgcctgg acgccatcac cggccccc gaggaaggcg	2340
ggcgcctgga gaccattctc ggctggccgc tggccgagcg caccgtggtg attccctcgg	2400
cgatccccac cgacccgcgc aacgtcggcg ggcacctcga cccgtccagc atccccgaca	2460
aggaacaggc gatcagcgcc ctgcccggact acgcccagcca gcccggcaaa ccgcccgcgc	2520
aggacctgaa gtaactgccc cgaccggccg gctcccttcg caggagccgg ctttcggg	2580
gcctggccat acatcaggtt ttcctgatgc cagcccaatc gaatatgaat tcggctgcta	2640
acaaagcccg aaaggaagct gagttggctg ctgccaccgc tgagcaataa ctagcataac	2700
cccttggcc tctaaacggg tcttggggg tttttgtgaa aaggaggaa ctatatccgg	2760
atcgaggatc aattctggcg taatagcgaa gaggcccgca ccgatcgccc ttcccaacag	2820
ttgcgtagcc tgaatggcga atggacgcg ccctgtagcg ggcattaaag cgcggcggt	2880
gtggtggtta cgcgacgt gaccgctaca cttgccagcg ccctagcgcc cgctccttc	2940
gctttcttcc cttcccttct cgccacgttc gccggcttc cccgtcaagc tctaaatcgg	3000

gggctccctt tagggttccg atttagtgct ttacggcacc tcgaccccaa aaaacttgat	3060
tagggtgatg gttcacgtag tgggccatcg ccctgataga cggttttcg cccttgacg	3120
ttggagtcg cgttctttaa tagtggactc ttgttccaaa ctggaaacaac actcaaccct	3180
atctcggtct attcttttga ttataaggg atttgccga ttccggccta ttggtaaaa	3240
aatgagctga tttaacaaaa atttaacgcg aattttaaca aaatattaac gtttacaatt	3300
tcaggtggca ctttcgggg aatgtgcgc ggaaccccta ttgtttatt ttctaaata	3360
cattcaaata tgtatccgct catgagacaa taaccctgat aaatgcttca ataatattga	3420
aaaaggaaga gtatgagttat tcaacatttc cgtgtcgccc ttattccctt tttgcggca	3480
tttgccttc ctgttttgc tcacccagaa acgctggta aagtaaaaga tgctgaagat	3540
cagttgggtg cacgagtggg ttacatcgaa ctggatcica acagcggtaa gatcctttag	3600
agtttgcgc cagaagaacg tttccaatg atgagcattt taaaagttct gctatgtggc	3660
gcggatttat cccgtattga cgccggcaa gagcaactcg gtcggccat acactattct	3720
cagaatgact tggttgagta ctcaccagtc acagaaaaac atcttacgga tggcatgaca	3780
gtaagagaat tatgcagtgc tgccataagc atgagtgata acactgcggc caacttactt	3840
ctgacaacga tcggaggacc gaaggagcta accgctttt ttcacaacat ggggatcat	3900
gtaactcgcc ttgatcggtt ggaaccggag ctgaatgaag ccataccaaa cgacgagcgt	3960
gacaccacga tgcctgtac aatggcaaca acgttgcgc aactattaac tggcgaacta	4020
cttactcttag ctccccggca acaattaata gactggatgg aggccgataa agttgcagga	4080
ccacttctgc gctcgccct tccggctggc tggtttattt ctgataaattc tggagccggt	4140
gagcgtgggt ctcgcggat cattgcagca ctggggccag atggtaagcc ctcccgatc	4200
gtagttatct acacgacggg cagttaggca actatggatg aacgaaatag acagatcgct	4260

gagataggtg cctcaactgat taagcattgg taactgttag accaagtttata	4320
cttttagattt attaaaaact tcatttttaa tttaaaagga tcttaggtgaa gatcctttt	4380
gataaatctca tgaccaaaaat cccttaacgt gagtttcgt tccactgagc gtcagacccc	4440
gtagaaaaaga tcaaaggatc ttcttgagat ccttttttc tgcgctaat ctgctgcttg	4500
caaacaaaaa aaccaccgct accagcggtg gtttgttgc cggatcaaga gctaccaact	4560
cttttccga aggttaactgg cttcagcaga gcgcagatac caaatactgt cttcttagtg	4620
tagccgtagt taggccacca cttaagaac tctgttagcac cgcc tacata cctcgctctg	4680
ctaattcctgt taccagtggc tgctgccagt ggcgataagt cgtgtcttac cgggttggac	4740
tcaagacgat agttaccgga taaggcgcag cggtcgggct gaacgggggg ttcgtgcaca	4800
cagcccgact tggagcgaac gacctacacc gaactgagat acctacagcg tgagcattga	4860
gaaagcgcca cgcttccga agggagaaag gcggacaggt atccggtaaag cggcagggtc	4920
ggaacaggag agcgcacgag ggagcttcca gggggaaacg cctggtatct ttatagtcct	4980
gtcgggtttc gccacctctg acttgagcgt cgattttgt gatgctcgtc agggggccg	5040
agcctatgga aaaacgcccag caacgcggcc ttttacggt tcctggcctt ttgctggcct	5100
tttgctcaca tggctttcc tgcgttatcc cctgattctg tggataaccg tattaccgcc	5160
tttgagttag ctgataccgc tcgcccgcagc cgaacgaccg agcgcagcga gtcagttagc	5220
gaggaagcgg aagagcgcct gatgcggat tttctcctta cgcatctgt cggtatttca	5280
caccgcata atggtgact ctcaacttacaa tctgctctga tgccgcatag ttaagccagt	5340
atacaactccg ctatcgctac gtgactgcaa ggagatggcg cccaacagtc ccccgccac	5400
ggggcctgcc accataccca cgccgaaaca agcgctcatg agcccgaagt ggcgagcccg	5460
atctccca tcggtgatgt cggcgatata ggcgccagca accgcacctg tggcgccggt	5520

gatgccggcc acgatgcgtc cggcgtagag gatcttgaga tctcgatccg cgaaat 5576 <210>
12 <211> 4263 <212> DNA <213> pKL4 plasmid full sequence <400> 12
taatacgact cactataggg agaccacaac ggttccctc tagaaataat tttgttaac 60
tttaagaagg agatatacat atgcatcacc atcaccatca cgatgtgaag ctggtgaaat 120
ctggaggagg cttagtgcag cctggagggt ccctgaaact ctcctgtgca acctctggat 180
tcacttcag tgactattac atgtattggg ttgcgcagac tccagagaag aggctggagt 240
gggtcgcata cattagtaat gatgatagtt ccggcgctt ttcagacact gtaaagggcc 300
ggttcaccat ctccagagac aatgccagga acaccctcta cctgcaaatg agccgtctga 360
agtctgagga cacagccata tattcctgtg caagaggact ggcctggga gcctggttt 420
cttactgggg ccaagggact ctggtcactg tctctgcagc caaaacgaca ccccatctg 480
tctatccact ggcccctgga tctgctgccc aaactaactc catggtgacc ctggatgcc 540
tggtaaggg ctattccct gagccagtga cagtgacctg gaactctgga tccctgtcca 600
gcggtgtgca cacttccca gctgtcctgc agtctgaccc ctacactctg agcagctcag 660
tgactgtccc ctccagcacc tggccagcg agaccgtcac ctgcaacgtt gcccacccgg 720
ccagcagcac caaggtggac aagaaaattg tgcccaggta ttgtgggtct aagccttgca 780
tagctacaca agttccggt ggtggcggat ctggaggtgg cggaagcggaa ggtcccgagg 840
tgacaggggg aatggcaagc aagtgggatc agaagggtat ggacattgcc tatgaggagg 900
cggccttagg ttacaaagag ggtgggtttc ctattggcgg atgtcttatac aataacaaag 960
acggaagtgt tctcggtcgt ggtcacaaca tgagattca aaagggatcc gccacactac 1020
atggtgagat ctccacttg gaaaactgtg ggagattaga gggcaaagtg tacaaagata 1080
ccacttgta tacgacgctg tctccatgctg acatgtgtac aggtgccatc atcatgtatg 1140

gtattccacg ctgtgttgc ggtgagaacg ttaattcaa aagtaagggc gagaaatatt	1200
tacaaactag aggtcacgag gttgttggc ttgacgatga gaggtgtaaa aagatcatga	1260
aacaatttat cgatgaaaga cctcaggatt ggttgaaaga tattggtag taggaattcg	1320
gctgctaaca aagcccgaaa ggaagctgag ttggctgctg ccaccgctga gcaataacta	1380
gcataacccc ttgggcctct aaacgggtct tgaggggttt tttgctgaaa ggaggaacta	1440
tatccggatc ggagatcaat tctggcgtaa tagcgaagag gcccgccaccg atcgcccttc	1500
ccaacagttg ctagcctga atggcgaatg ggacgcgccc tgttagcggcg cattaagcgc	1560
ggcgggtgtg gtggttacgc gcagcgtgac cgctacactt gccagcgcgg tagcgcggc	1620
tccttcgct ttctccctt ccttctcgcc cacgttcgccc ggcttcccc gtcaagctct	1680
aaatcggggg ctcccttag ggttccgatt tagtgcttta cggcacctcg accccaaaaaa	1740
acttgatttag ggtgatggtt cacgttgtt gccatcgccc tgatagacgg ttttcgccc	1800
tttgacgtt gagtccacgt tcttaatag tggactcttgc ttccaaactg gaacaacact	1860
caaccctatc tcggtctatt ctttgattt ataaggatt ttgccgattt cggcctatttgc	1920
gttaaaaaat gagctgattt aacaaaaatt taacgcaat ttaacaaaa tattaacgtt	1980
tacaattca ggtggcactt ttccggaaa tgtgcgcgaa acccctattt gtttattttt	2040
ctaaatacat tcaaataatgt atccgctcat gagacaataa ccctgataaa tgcttcaata	2100
atattgaaaa aggaagagta tgagtattca acatttcgt gtcgccttta ttccctttt	2160
tgcggcattt tgccttccttgc ttttgtca cccagaaacg ctgggtgaaag taaaagatgc	2220
tgaagatcag ttgggtgcac gagtggttta catcgaactg gatctcaaca gcggtaagat	2280
ccttgagagt tttcgccccg aagaacgttt tccaatgatg agcacttttta aagtctgtct	2340
atgtggcgcg gtattatccc gtattgacgc cggcaagag caactcggc gcccataca	2400

ctattctcag aatgacttgg ttgagtactc accagtaca gaaaagcatc ttacggatgg	2460
catgacagta agagaattat gcagtgctgc cataagcatg agtgataaca ctgcggccaa	2520
cttacttctg acaacgatcg gaggaccgaa ggagctaacc gcttttttc acaacatggg	2580
ggatcatgta actcgccctg atcggtggaa accggagctg aatgaagcca taccaaacga	2640
cgagcgtgac accacgatgc ctgttagcaat ggcaacaacg ttgcgcaaac tattaactgg	2700
cgaactactt actctagctt cccggcaaca attaatagac tggatggagg cgatggaa	2760
tgcaggacca cttctgcgct cggcccttcc ggctggctgg ttattgctg ataaatctgg	2820
agccggtgag cgtgggtctc gcggtatcat tgcagcactg gggccagatg gtaagccctc	2880
ccgtatcgta gttatctaca cgacggcag tcaggcaact atggatgaac gaaatagaca	2940
gatcgctgag ataggtgcct cactgattaa gcattggtaa ctgtcagacc aagttactc	3000
atataactt tagattgatt taaaactca ttttaattt aaaaggatct aggtgaagat	3060
ccttttgat aatctcatga cccaaatccc ttaacgtgag tttcggtcc actgagcgtc	3120
agaccccgta gaaaagatca aaggatcttc ttgagatcct tttttctgc gcgtaatctg	3180
ctgcttgcaa aaaaaaaaaac caccgctacc agcgggggtt tggccggg atcaagagct	3240
accaactctt ttccgaagg taactggctt cagcagagcg cagataccaa atactgtcct	3300
tcttagttag ccgttagttag gccaccactt caagaactct gtgcacccgc ctacataacct	3360
cgctctgcta atcctgttac cagtggctgc tgccagtggc gataagtctgt gtcttaccgg	3420
gttggactca agacgatagt taccggataa ggccgcggc tcggctgaa cgggggggttc	3480
gtgcacacag cccagcttgg agcgaacgac ctacaccgaa ctgagatacc tacagcgtga	3540
gcattgagaa agcgccacgc ttcccgaaagg gagaaaggcg gacaggtatc cggtaaacgcgg	3600
cagggtcgga acaggagagc gcacgaggga gcttccaggaa gggaaacgcct ggtatcttta	3660

tagcctgtc gggtttcgcc acctctgact tgagcgtcga ttttgtat gctcgtcagg	3720
ggggccgagc ctatggaaaa acgccagcaa cgccgcctt ttacggttcc tggcctttg	3780
ctggccttt gctcacatgt tcttcctgc gttatccctt gattctgtgg ataaccgtat	3840
taccgcctt gagttagctg ataccgctcg ccgcagccga acgaccgagc gcagcgtc	3900
agttagcgtg gaagcggaag agcgcctgat gcggatattt ctccttacgc atctgtgcgg	3960
tatttacac cgcataatag gtgcacttc agtacaatct gctctgatgc cgcataatgtta	4020
agccagttata cactccgcta tcgctacgtg actgcaagga gatggcgccc aacagtcccc	4080
cggccacggg gcctgccacc atacccacgc cgaaacaagc gctcatgagc ccgaagtggc	4140
gagcccgatc ttccccatcg gtgatgtcg cgatataggc gccagcaacc gcacctgtgg	4200
cggccgtat gccggccacg atgcgtccgg cgttagaggat cttagatct cgatccgcga	4260 aat
4263	

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER: _____**

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.